

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES PROMOTORES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN
XINANTÉCATL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

IRÁN TAPIA VÁZQUEZ

ASESOR: JORGE LUIS FOLCH MALLOL

CO-ASESOR: RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2020

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Dedicatoria | 5 |
| Agradecimientos | 6 |
| CAPÍTULO I | 9 |
| 1.0 INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1 Agricultura y capo mexicano | 10 |
| 1.2 Uso de fertilizantes | 10 |
| 1.3 Organismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal | 11 |
| 1.4 Ecosistemas fríos | 13 |
| Organismos psicrófilos y psicrotolerantes | 13 |
| Volcán Xinantécatl | 14 |
| 1.5 Jitomate, cultivo de interés nacional | 15 |
| Daño fisiológico del jitomate causado por bajas temperaturas | 17 |
| 2.0 ANTECEDENTES | 19 |
| 3.0 JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4.0 HIPÓTESIS | 24 |
| 5.0 OBJETIVO GENERAL | 24 |
| 6.0 OBJETIVOS PARTICULARES | 24 |
| CAPÍTULO II | 25 |
| 7.0 METODOLOGÍA Y RESULTADOS | 26 |
| 7.1 Prospección de microorganismos | 26 |
| 7.1.1 Aislamiento de microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes a partir de suelo rizosférico | 26 |
| 7.2 Identificación molecular | 28 |
| 7.3 Caracterización de general de los microorganismos aislados | 34 |
| 7.4 Determinación de psicrofilia o psicrotolerancia de las cepas aisladas | 34 |
| 7.5 Promoción del crecimiento vegetal | 37 |
| 7.5.1 Caracterización bioquímica | 36 |
| 7.5.2 Pruebas <i>in vitro</i> de germinación de semillas de jitomate. | 43 |
| 7.5.3 Promoción del crecimiento de plántulas de jitomate, prueba <i>in vitro</i> | 48 |
| 7.5.4 Promoción del crecimiento vegetal, condiciones de invernadero | 52 |

| | |
|--|----|
| 7.6 Prueba de control biológico contra fitopatógenos | 55 |
| CAPÍTULO III | 59 |
| 8.0 DISCUSIÓN | 60 |
| 9.0 CONCLUSIONES | 63 |
| 10. REFERENCIAS | 65 |
| 11.0 APÉNDICES Y ANEXOS | 71 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Códigos de identificación de los aislados | 27 |
| Tabla 2 A. Identificación de parientes cercanos de levaduras | 30 |
| Tabla 2 B. Identificación de parientes cercanos de bacterias | 31 |
| Tabla 3. Características generales de los aislados | 34 |
| Tabla 4. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de levaduras | 35 |
| Tabla 5. Tiempo de duplicación de bacterias | 36 |
| Tabla 6. Porcentaje de inhibición de fitopatógenos | 56 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal | 13 |
| Figura 2. Fotografías de la zona del cráter del volcán Xinantécatl | 15 |
| Figura 3. Producción y exportación de jitomate | 16 |
| Figura 4. Etapas fenológicas de plantas de <i>S. lycopersicum</i> | 17 |
| Figura 5. Daños a frutos de <i>S. lycopersicum</i> causados por bajas temperaturas | 18 |
| Figura 6. Caracterización de bacterias aisladas del glaciar Pico Bolivar | 21 |
| Figura 7. Evaluación de la promoción del crecimiento mediado por levaduras provenientes de la filósfera de <i>Drosera spatulata</i> | 22 |
| Figura 8. Zona del cráter del volcán Xinantécatl; Sitios de muestreo | 27 |
| Figura 9. Fotografías de los 12 aislados del volcán Xinantécatl | 28 |
| Figura 10. Árbol filogenético de levaduras | 32 |
| Figura 11. Árbol filogenético de bacterias | 33 |
| Figura 12. Crecimiento de las levaduras aisladas del volcán Xinantécatl | 36 |
| Figura 13. Prueba de solubilización de fosfatos | 38 |
| Figura 14. Producción de IAA. | 39 |
| Figura 15. Actividad de sideróforos | 40 |
| Figura 16. Pruebas bioquímicas cualitativas | 41 |
| Figura 17. Mapa de calor de los resultados de la caracterización bioquímica | 42 |
| Figura 18. Modelo de inoculación 1. Prueba de germinación de semillas de jitomate | 44 |
| Figura 19. Modelo de inoculación 2. Prueba de germinación de semillas de jitomate | 44 |
| Figura 20. Prueba de germinación sobre el modelo de inoculación 2 | 46 |
| Figura 21. Fotografías de plántulas provenientes de la prueba de germinación | 47 |
| Figura 22. Datos experimentales y fotografías de plántulas | 49 |
| Figura 23. Modelo experimental. Promoción del crecimiento de plántulas en frasco | 50 |
| Figura 24. Experimento de promoción del crecimiento en frascos. 15°C | 50 |
| Figura 25. Experimento de promoción del crecimiento en frascos. 22°C | 51 |
| Figura 26. Prueba de promoción del crecimiento de plántulas en frasco, inoculadas con las cepas Ng1 y Rh2 | 52 |
| Figura 27. Prueba de estrés por frío | 53 |
| Figura 28. Crecimiento de plantas en condiciones de invernadero | 54 |
| Figura 29. Prueba de control biológico | 57 |
| Figura 30. Fitoprotección en hojas | 58 |

Dedicatoria.

A Padme y Lucas.

Ustedes me han enseñado que los grandes logros se obtienen del sacrificio de muchos y con el amor de todos.

La capacidad inventiva y de asombro, renació en mí con su llegada.

Agradecimientos

A mis tutores:

Dr. Jorge Luis Folch Mallol. Por ser el responsable principal de mi formación científica y contribuir en gran parte, con su maravilloso ejemplo, en mi formación personal.

Dr. Ramón Alberto Batista García, por enseñarme a soñar en grande.

A mis sinodales. Por su apoyo, orientación y contribuciones para consolidar mi formación académica y personal.

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango.

Dra. Verónica Lira Ruan

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada (267343).

Al Centro de Investigación en Biotecnología, por ser mi segundo hogar y proveerme de los medios necesarios para consolidar mi formación profesional.

A la Facultad de ciencias Biológicas, por abrirme las puertas y dejarme ser parte de su historia.

A la Universidad Autónoma del estado de Morelos, por todos los beneficios que me ha dado desde el inicio de mi formación profesional.

A la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, por ser amiga y mentora. Por sus consejos y apoyo en todos los aspectos.

A la M. en B. María del Rocío Rodríguez Hernández, por su amistad, paciencia y por su amable asistencia en el laboratorio.

Al M. en C. Carlos Alberto González Chávez. Por la amable y valiosa asistencia técnica en el establecimiento experimental del cultivo de plantas en invernadero.

Al Dr. Daniel Padilla Chacón. Por ser otro de mis mentores y apoyarme incondicionalmente siempre.

Al Dr. Ayixon Sánchez Reyes, por ser un gran amigo y compartir conmigo sus maravillosos conocimientos en filogenias.

Agradecimientos.

A Jaime, por su amor y ternura y por apoyar mis sueños dejando muchas veces en pausa los suyos para ayudarme a brillar.

A mis hijos, Padme y Lucas, por ser el motivo latente de salir adelante y colmarme de amor.

A mis papás, porque ya sea desde la eternidad o en el plano terrenal, nunca me han abandonado.

A Tere, Fátima y Rosaura. Por darme apoyo incondicional, la motivación para continuar y los medios para seguir de pie.

A mis amigos del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos. Por darme tantos momentos buenos, por las risas, las charlas y hacer amenos los días. A su lado no existe la rutina, solo momentos memorables.

A Marisol, por mostrarme que enseñando es la mejor forma de aprender. Por su paciencia y dedicación.

A Issac, por apoyarme en los inicios del proyecto, convirtiéndose en un gran amigo.

A Ricardo y Giovanni, por su amistad y empatía. Por la estrecha colaboración en el proyecto y por darme ánimo cuando las plantas no daban “frutos dulces”.

A Tania y Karen, por mantener el entusiasmo en el proyecto y creer en mí.

Abstract.

With the goal of finding sustainable solutions for the use of agrochemicals, we devoted to the isolation of psychrophile and psychrotolerant Plant Growth Promoting Microorganisms (PGPM). Eighth yeast and four bacterial strains were isolated from soil collected at the glacier of the Xinantécatl volcano in Mexico and characterized for Plant Growth Promoting characteristics. Most of the yeast produced Indole Acetic Acid and hydrolytic enzymes (CMCases, xilanases, and chitinases), but none of them produced siderophores, in contrast with their bacterial counterparts. Inorganic phosphate solubilization was detected for all the bacterial strains and for in two yeast strains.

The microorganisms were identified to the genera level using ribotyping techniques and phylogenetic analysis. Bacterial strains belonged to the genus *Pseudomonas*, while the yeast strains were *Rhodotorula* sp (4), *Mrakiella* sp. (3), and *Naganishia* sp (1).

Plant growth promoting activity on *Solanum lycopersicum* plants was detected for yeast strains with respect to a control in MS media only.

This study opens the possibility to use these strains as an additive to improve the culture conditions of *S. lycopersicum* in a more environmental friendly way.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Agricultura y campo mexicano

En los países en desarrollo, la mayoría de los productores activos del sector de alimentos son agricultores de pequeña escala que forman parte de la economía rural. La introducción de nuevos sistemas agrícolas y de tecnologías mejoradas es muy importante para ellos, dado que el aumento de la productividad resulta no sólo en más alimentos sino también en más ingresos económicos. (IFA 2002).

Con el objetivo de aumentar los rendimientos en las cosechas, aminorar costos y asegurar el sano desarrollo de sus cultivos, los productores hacen uso de varias tecnologías agrícolas, siendo los fertilizantes químicos (sintéticos) aplicados en el 62.4% de la superficie agrícola, la técnica más empleadas, le siguen los herbicidas con el 53.6%, los insecticidas con el 39.1%, las semillas mejoradas con el 34 %, abonos naturales con el 8.5%, así como la quema controlada que se aplica al 3.7 % de la superficie agrícola. Sin embargo, las mejoras que cada una de las tecnologías implementadas pudiera representar, se ven disminuidas cuando los cultivos se enfrentan a condiciones ambientales que no son las óptimas para su sano desarrollo.

El estrés ambiental es una fuerte restricción para la productividad y la extensión de los cultivos. Se estima que únicamente un 10% de la superficie de tierra arable se encuentra libre de estrés. Cerca del 20% de la tierra presenta algún tipo de deficiencia o toxicidad mineral, 25% es afectada por estrés por sequía y 15% por congelación (Blum, 1988). Incluso, bajo condiciones de producción protegida como invernaderos y túneles se presentan eventos de estrés biótico y abiótico que disminuyen la productividad y calidad de los cultivos.

Los intentos para disminuir los distintos tipos de estrés, o para mejorar la resistencia de las plantas a dicho estrés, tendrán mayor alcance si se entiende el trasfondo fisiológico y bioquímico sobre el cual transcurren las respuestas de las plantas. Con ello es posible desarrollar estrategias para disminuir los daños y pérdidas ocasionadas por estrés.

1.2 Uso de fertilizantes

La agricultura convencional juega un papel importante en la aportación de alimentos que satisfacen la demanda mundial de la población humana. Con ello se ha incrementado la dependencia por los fertilizantes químicos sintéticos.

Los fertilizantes químicos sintéticos son sustancias manipuladas industrialmente que contienen al menos un elemento químico necesario para el ciclo de vida de las plantas. Comúnmente, suelen contener cantidades conocidas de Nitrógeno, Fósforo y Potasio.

Actualmente la agricultura depende del uso de grandes cantidades de fertilizantes químicos sintéticos para incrementar el rendimiento de sus cosechas.

Daños causados por fertilizantes

Los fertilizantes químicos sintéticos, aumentan la productividad agrícola en los primeros años que se usan, sin embargo, se sabe que la productividad no se sostiene por mucho tiempo. La dependencia por fertilizantes nitrogenados en el mundo aumenta cada año y su precio también se incrementa, esto debido a que el petróleo es fundamental para su elaboración, tanto como materia prima como la energía derivada de este. (SAGARPA- COFUPRO-UNAM, 2013; Biofábrica Siglo XXI).

El nitrógeno residual, que queda acumulado en los campos de cultivo, después de ser asimilado mínimamente por las plantas, tiende a lixiviarse. Dado que algunas de sus formas son solubles en agua, el nitrógeno no utilizado, termina en cuerpos béticos como ríos, lagos y mares, causando la eutrofización de los mantos acuíferos, es decir, se aumentan las concentraciones de nutrientes, provocando que algunos tipos de organismos crezcan aceleradamente, por ejemplo, algunas algas que, al aumentar su población, no dejan pasar la luz a través del agua, disminuyendo la producción pecuaria. Se sabe también que el consumo de agua con cantidades altas de nitratos tiene efectos en la salud de las personas. El nitrógeno se pierde también por la volatilización de los gases que se producen en el suelo, amonio, óxido nítrico y óxido nitroso. Los productos transformados de los fertilizantes nitrogenados que se liberan como gases, tienen efectos negativos en el ambiente ya que constituyen a los gases de efecto invernadero, contribuyendo al cambio climático, también pueden generar otros efectos como lluvia ácida y la ruptura de la capa de ozono (SAGARPA- COFUPRO-UNAM, 2013; Biofábrica Siglo XXI).

Los fosfatos de los fertilizantes químicos también son responsables de la contaminación ambiental y se han asociado a un aumento en la incidencia de enfermedades nerviosas de gravedad (SAGARPA- COFUPRO-UNAM, 2013; Biofábrica Siglo XXI).

Frente a estas y otras tantas desventajas que trae consigo el uso de agroquímicos, se han propuesto y empezado a implementar estrategias alternativas a su uso, que al igual que estos, sean capaces de aumentar la producción agrícola. Una de las principales estrategias se ha enfocado en la generación e implementación de fertilizantes de base biológica.

El uso de bio fertilizantes e inoculantes microbianos es una de las tantas estrategias que no sólo garantizan la seguridad alimentaria, sino también suma a la biodiversidad del suelo. En este tipo de agricultura principalmente se depende de la microflora natural del suelo constituida por todos los tipos de bacterias y hongos capaces de promover el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas, entre estos microorganismos encontramos a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), hongos micorrízicos arbusculares (AMF) y los hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF).

1.3 Organismos Rizosféricos Promotores del Crecimiento Vegetal.

La rizósfera es la región del suelo donde habitan las diversas comunidades microbianas que se ven influenciadas por los compuestos exudados de las raíces de las plantas (Rojas-Solís, *et al.*, 2013). También se puede definir como una zona estrecha del suelo que rodea las raíces de las plantas. Esta zona puede contener hasta 10^{11} células microbianas por gramo de raíz (Egamberdieva, *et al.* 2008) y por encima de 30, 000 especies procariotas, cuyas

interacciones son determinantes para la salud de los cultivos en agroecosistemas naturales al proveer de diferentes beneficios a las plantas de cultivo (Berg , *et al.* 2013).

Kloepper y Schroth (1980) propusieron por primera vez el uso del término rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) por sus siglas en inglés para nombrar a las bacterias que habitan en la rizosfera y que presentan la propiedad de estimular el crecimiento y la salud vegetal (Rojas-Solís, *et al.*, 2013).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) pueden ser encontrados en la rizosfera, sobre la superficie de la raíz o asociados a ella. Son bacterias de vida libre capaces de incrementar el crecimiento vegetal y proteger a las plantas de enfermedades y estrés biótico y abiótico a través de una amplia variedad de mecanismos (Dimkpa *et al.*, 2009; Grover *et al.* 2011) cuando son aplicadas a semillas o cultivos (Kumar, *et al.* 2014). También llevan a cabo la descomposición de materia orgánica, ayudan a la captación de nutrientes, favorecen la absorción de agua, reciclaje de nutrientes y control de humedad, así como algunas especies participan como agentes de bio control (Berg , *et al.*, 2013).

Existen varias clasificaciones para referirse a los métodos por los que se estimula el crecimiento vegetal, siendo la más usada la que los divide en mecanismos indirectos y directos. Los métodos indirectos son aquellos donde las bacterias sintetizan metabolitos capaces de inhibir o disminuir la proliferación de infecciones, como antibióticos, sideróforos (encargados de quelar los metales esenciales para los organismos patógenos), proteínas remodeladoras de pared celular, celulasas, xilanasas y quitinasas, u otros metabolitos que tienen un efecto inhibitorio sobre organismos fitopatógenos (Glick, 1995; Ahmad *et al.*, 2008; Rojas-Solís, *et al.*, 2013).

Los segundos son aquellos donde la bacteria puede influir positivamente en el crecimiento de la planta por medio de la síntesis y excreción de sustancias fitoestimuladoras, que pueden incluir diversos tipos de fitohormonas como las auxinas (IAA), citocininas, ácido abscísico (ABA), entre otras; reducen el Fe(III) a Fe(II); sintetizan y emiten compuestos orgánicos volátiles involucrados en la promoción de las raíces primaria y laterales, como lo es el 2,3-butanediol, acetoina, aldehídos, cetonas y alcoholes; incluso pueden activar la producción *in planta* de compuestos que refuerzan la inmunidad vegetal como ácido jasmónico, ácido salicílico y fitoalexinas (Ahmad *et al.*, 2008; Rojas-Solís, *et al.*, 2013), son capaces de fijar nitrógeno biológico, solubilizar fosfatos u otros nutrientes esenciales, pueden llevar a cabo la desaminación de la molécula precursora de la fitohormona etileno (cuya acumulación en la raíz se sabe que es perjudicial para el crecimiento de raíces y desarrollo de las plantas (Glick *et al.* 1998)) por actividad de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC deaminasa), se caracterizan también por la producción de sideróforos (Katiyar y Goel 2004), que le facilita la captación de hierro al vegetal. Figura 1.

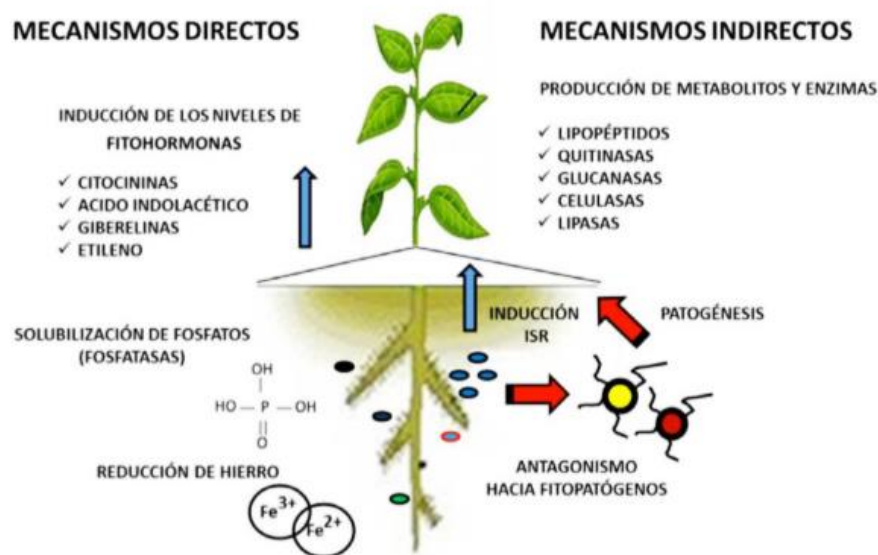


Figura 1. Mecanismos directos e indirectos de estimulación del crecimiento vegetal mediado por bacterias. (Tomado de Rojas- Solís, *et al.*, 2013).

1.4 Ecosistemas fríos

Organismos psicrófilos y psicrotolerantes

El clima condiciona el crecimiento y desarrollo de los cultivos mediante la conjugación de tres variables principales; la luz, la humedad y la temperatura (Coelho y Dale, 1980).

Las plantas están bajo la influencia del clima edáfico, ya que persisten a nivel de la rizosfera durante todo su ciclo biológico, siendo determinante en la regulación de procesos fisiológicos de trascendencia agronómica (Navarro Farías, 1994). La germinación y el crecimiento de las raíces, la absorción de los nutrientes y la disponibilidad de oxígeno, entre otros procesos, son dependientes de la temperatura del suelo.

En climas templados, el crecimiento y la actividad de las comunidades rizosféricas es altamente dependiente de la temperatura de la zona de la raíz ya que la mayoría de los procesos fisiológicos que influyen en el crecimiento vegetal se desarrollan en ella y prácticamente se paraliza a temperaturas por debajo de las óptimas. En tal escenario, es importante que las bacterias que colonizan las raíces conserven su versatilidad metabólica a bajas temperaturas.

Desde hace varios años, se conocen microorganismos que tienen la capacidad de crecer en condiciones de temperatura baja. Estos microbios colonizan con éxito los hábitats fríos, que componen más del 80% de la biosfera terrestre, y juegan un papel importante en los procesos de renovación de nutrientes a bajas temperaturas (Selvakumar., 2010; Kottmeier., 1990).

Los organismos adaptados al frío pueden crecer incluso en temperaturas inferiores a los 0 °C y se clasifican como psicrófilos si su temperatura óptima máxima de crecimiento es ≤ 20 °C, y se denominan psicrotolerantes cuando los organismos tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 40 °C, pero son capaces de seguir creciendo en temperaturas cercanas a 0 °C (Morita, 1975; Robinson., 2001; Hamid, *et al.*, 2014).

A lo largo del periodo Cuaternario (los últimos 2 millones de años), el clima del planeta ha oscilado entre fases frías (llamadas glaciales) y otras relativamente calientes, similares a la actual (o interglaciales). Cuando el clima se enfría, afecta por igual a toda una gran región, pero en las cimas de las altas montañas este cambio puede ser dramático si la precipitación, antes líquida, se vuelve predominantemente sólida (nieve) y las bajas temperaturas permiten la preservación de la nieve y su gradual transformación en un glaciar. En cambio, cuando el clima se calienta, los hielos se funden, y de ellos no quedan sino rastros geomorfológicos (Luna, *et al.*, 2009).

Los glaciares y periglaciares (zonas que están cerca de los glaciares, donde ocurren procesos de hielo y deshielo a lo largo del año, y muestran geomorfología típica producida por el fenómeno de alternancia de temperaturas) almacenan una amplia diversidad de microorganismos adaptados al frío, metabólicamente versátiles, muchos de ellos, con capacidad de producir enzimas activas en frío, con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Volcán Xinantécatl.

El volcán Nevado de Toluca (99°45'O; 19°09'N; 4690 msnm) llamado también Xinantécatl, es la cuarta cima más alta de México y está ubicado a 23 y a 80 km al suroeste de las ciudades de Toluca y México, respectivamente.

Las geofomas glaciales del Nevado de Toluca son un testimonio de los drásticos cambios climáticos ocurridos en los últimos milenios en el centro del país.

La morfología del cráter es muy compleja y es el resultado de la gran cantidad de erupciones y de eventos tectónicos que han modelado la estructura volcánica, que está conformada tanto por derrames de lava como por depósitos piroclásticos: cenizas y pómez (García-Palomo, *et al.*, 2002). En el cráter resalta la presencia de varios picos; el más alto de éstos se conoce como Pico El Fraile, que es un remanente de un domo de lava parcialmente destruido por las mismas erupciones del Nevado. El cráter actual es de forma elongada en dirección este-oeste, con dimensiones de 2 x 1.5 km; está abierto hacia el este y tiene forma de herradura. En el interior del cráter se encuentra el domo de lava conocido como El Ombligo, el cual fue producido inmediatamente después de la última gran erupción del Nevado de Toluca, ocurrida hace ~10500 años. Este domo separa a los dos lagos conocidos como lago El Sol y lago La Luna, que se hallan a una elevación de 4200 msnm. (Luna, *et al.*, 2009).

Actualmente el Nevado de Toluca no hace tanto honor a su nombre. Tal vez esté pasando por uno de los momentos de menos nieve de los últimos 20 mil años. Por sus 4680 m de altitud, ocupa el cuarto lugar entre las cumbres más altas de México, sólo por debajo del Citlaltépetl, el Popocatepetl y el Iztaccíhuatl. Sin embargo, la diferencia de altitud hace que, mientras en éstos subsisten pequeños glaciares, en las cimas del Nevado las temperaturas no son suficientemente frías para que la nieve acumulada año con año permanezca sobre el terreno y se convierta en un glaciar, es decir, en una masa de hielo permanente, con metros o decenas de metros de espesor y en lento movimiento. No obstante, en sus laderas hay claras evidencias geomorfológicas de la presencia de glaciares en el pasado. (Luna, *et al.*, 2009).

Probablemente hace unos 7 mil años el fondo del cráter quedó libre de hielo. En las depresiones resultantes de la última erupción volcánica y de la erosión glacial se formaron los lagos que hoy conocemos. Desde entonces no ha habido glaciares verdaderos en el Nevado de Toluca, aunque sí formaciones conocidas como glaciares rocosos, propios de un ambiente periglacial (casi glacial). (Luna, *et al.*, 2009).

El volcán está activo sísmicamente y aunque su actividad eruptiva no se ha registrado desde hace aproximadamente 3300 años, se considera un volcán activo. De acuerdo con su formación geológica (roca encajonante “caolinita-pirita”) y a los criterios de clasificación FAO-UNESCO, el Nevado de Toluca se caracteriza por tener suelos de tipo Andosol Úmbricos, Regosol Eútricos y Feozem. compuesto de calcio, fósforo, hierro, silicio, zinc, potasio, carbono, sulfato y estroncio.

La temperatura media anual es de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. En las faldas del volcán el clima es templado y muy lluvioso en verano, fresco y muy frío en invierno; en la cumbre, fresco y frío en verano, polar de alta montaña en invierno o cuando está nevado. A los 4100 m. de altura se desarrollan bosques de encinas y coníferas, grimos, helechos y arbustos; a mayor altura sólo crecen las gramíneas, pastos, musgos y algas (Luna, *et al.*, 2009). Figura 2.



Figura 2. Fotografías de la zona del cráter del volcán Xinantécatl o Nevado de Toluca. A) Fotografía en primavera (Monero García, *et al.*, 2009) cuando el paisaje luce como un glaciar rocoso; B) Fotografía en invierno, cuando el volcán se cubre de nieve. (Tomada de <https://guiauniversitaria.mx/5-opciones-de-tour-para-visitar-nevado-de-toluca-en-invierno/>) Ambas fotografías muestran el lago del Sol y la formación que separa a los lagos del sol y la luna, denominada ombligo.

1.5 Jitomate, Cultivos de interés nacional.

El cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los más importantes a nivel mundial, siendo México el país que ocupa el segundo lugar en exportación y doceavo lugar en producción de este fruto (SFA, 2010). México fue el principal exportador de tomate en 2014 en términos de volumen, sin embargo, en cuanto al valor de las ventas al exterior, fue superado por Holanda. Figura 3. A y B. En el año 2017, se posicionó como el líder mundial de exportación de este fruto. (SAGARPA, 2017).

La producción de tomate está altamente concentrada; en cinco entidades se produjo el 54.1 % del total nacional en 2015: Sinaloa (27.4 %), Michoacán (7.2 %), San Luis Potosí (7.2 %), Baja California (7.1 %) y Jalisco (5.2 %). (FIRA, 2016). En el estado de Morelos, se

cosecharon dos mil 365 hectáreas de jitomate en 2018, con un rendimiento promedio de 47.63 toneladas por hectárea, de acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) y , colocándose dentro de las 10 primeras posiciones de las entidades con mayor producción de la hortaliza..Figura 3 C.

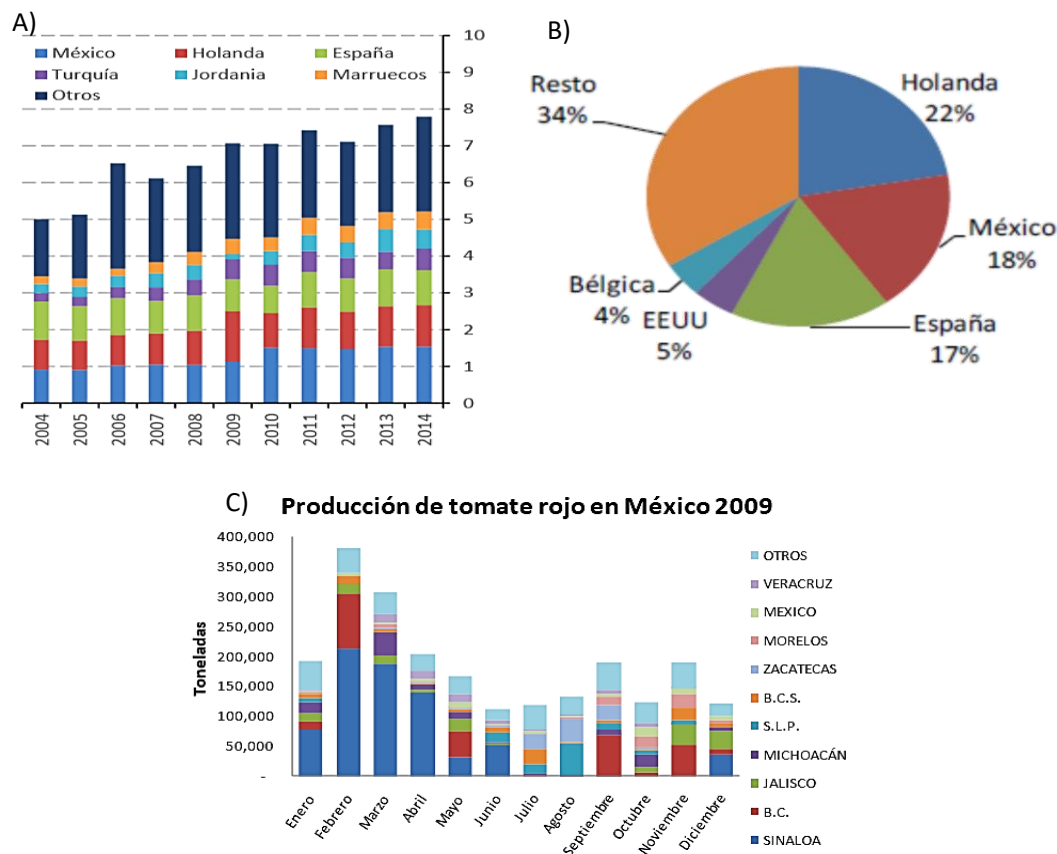


Figura 3. Producción y exportación de jitomate. A) Principales países productores de jitomate en el mundo; B) Principales países exportadores de jitomate a nivel mundial; C) Estados productores de jitomate en México.

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama Agroalimentario Tomate Rojo 2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroalimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf)

En el mercado nacional, los precios del jitomate difieren de acuerdo con el tipo de producto (“orgánico”, producido a cielo abierto o en invernadero, etc.) y de la variedad, principalmente. Además de posibles afectaciones al cultivo por fenómenos meteorológicos o sanitarios, la estacionalidad de la producción, así como el flujo de las exportaciones, repercuten de manera importante en la disponibilidad del producto en el mercado nacional y por lo tanto, en la volatilidad de los precios de esta hortaliza.

La fenología del cultivo comprende las etapas que forman su ciclo de vida. Dependiendo de la etapa fenológica de la planta, son sus demandas nutricionales, necesidades hídricas, susceptibilidad o resistencia a insectos y enfermedades.

En el cultivo del jitomate, se observan 3 etapas durante su ciclo de vida:

Inicial: Comienza con la germinación de la semilla. Se caracteriza por el rápido aumento en la biomasa, la planta invierte su energía en la síntesis de nuevos tejidos de absorción y fotosíntesis.

Vegetativa: Esta etapa se inicia a partir de los 21 días después de la germinación y dura entre 25 a 30 días antes de la floración. Requiere de mayores cantidades de nutrientes para satisfacer las necesidades de las hojas y ramas en crecimiento y expansión.

Reproductiva: Se inicia a partir de la fructificación, dura entre 30 o 40 días, y se caracteriza porque el crecimiento de la planta se detiene y los frutos extraen los nutrientes necesarios para su crecimiento y maduración (Bolaños, 2001). Figura 4.

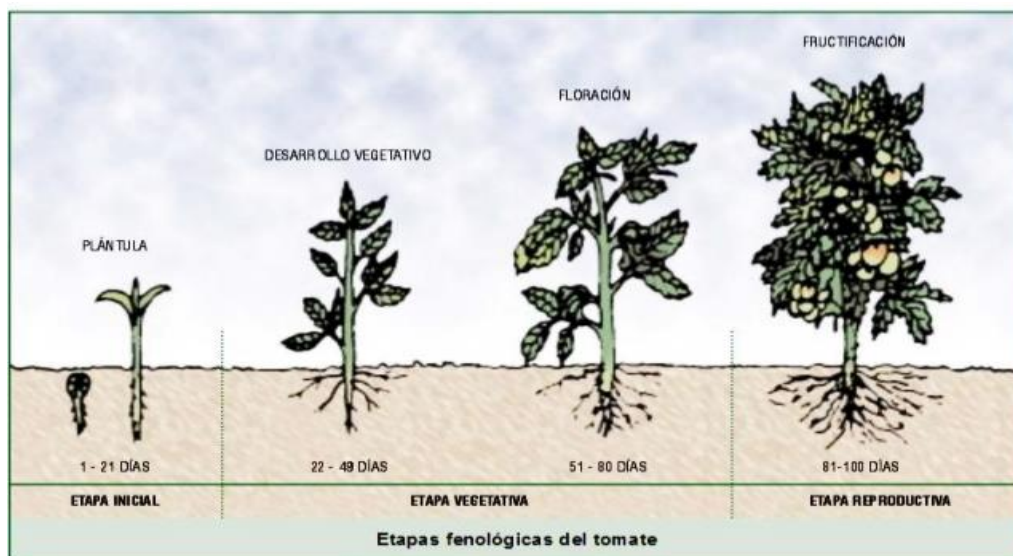


Figura 4. Etapas fenológicas de plantas de *S. lycopersicum* L. Tomado de <https://www.slideshare.net/hazaelalfonzo/establecimiento-de-una-plantacin-hortcola>.

La temperatura de crecimiento de las plantas de jitomate va de 20-25 durante el día y de 13-17 durante la noche. Temperaturas fuera del rango, manifiestan daños fisiológicos en las plantas. Cuando son superiores a 25°C e inferiores a 12°C la fecundación es defectuosa o nula. En general, las temperaturas inferiores al promedio retrasan el crecimiento de las plantas, detienen la floración y generan cambios en la morfología de los frutos (Huerres y Carballo, 1988).

Daño fisiológico del jitomate causado por bajas temperaturas.

Un cultivo cuya temperatura está por debajo del mínimo requerido (17 a 19°C), sufren problemas fisiológicos, como, reducción en la fertilidad del polen, el ovario se deforma, es común observar racimos de frutos muy grandes que se bifurcan con el aspecto de manos, los entrenudos se acortan, el nitrógeno en exceso tiene un efecto contrario al producido en condiciones cálidas- templadas (plantas se reduce en crecimiento), aumenta el número de

jitomates bofos o huecos, aumenta el número de lacras en los frutos, si las temperaturas bajan de 5 °C. En ciertas variedades aumenta el número de frutos deformes. Figura 5.

Si la temperatura baja a -2 °C (el punto mínimo de resistencia) las plantas mueren, si ésta permanece por dos horas continuas. Las hojas de la planta se enrollan como medio de defensa contra las temperaturas extremas. (Valerio, 2012).

LeBoeuf (2004), menciona que a temperaturas entre 0 y 5 °C hay retraso del crecimiento, marchitez, picaduras en la superficie o necrosis del follaje, y una mayor susceptibilidad a enfermedades.

Temperaturas por debajo de 10 °C durante la floración: pueden interferir con la polinización y provocar la caída de la fruta.

Solanum lycopersicum es fuertemente afectado por las bajas temperaturas, por lo que sería un buen modelo para probar las cepas psicrófilas y psicrotolerantes, tanto para determinar sus características promotoras del crecimiento vegetal, como para ver el efecto que pudieran tener al revertir o amortiguar el estrés por frío.



Figura 5. Daños a frutos de *S. lycopersicum* causados por bajas temperaturas.

<https://www.hortalizas.com/horticultura-protegida/impacto-de-temperaturas-extremas-en-el-tomate/>.

2. ANTECEDENTES

Los microorganismos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la producción y productividad de cualquier agroecosistema a través de una gran variedad de mecanismos benéficos para las plantas.

La auxina, indol-3-acético (IAA), es una fitohormona importante producida por las PGPR. El tratamiento con auxinas ha demostrado que aumenta el crecimiento de las plantas (Patten y Glick 2002).

Selvakumar *et al.* (2008) reportó a *Pantoea dispersa* y *Serratia marcescens* como bacterias tolerantes al frío promotoras del crecimiento vegetal. Estas cepas mantuvieron su capacidad de producir IAA a 4 y 15 °C.

Mishra *et al.* (2008, 2009) describió la tolerancia al frío y la producción de IAA por *Pseudomonas sp.* El género *Pseudomonas* es un componente importante de la comunidad microbiana de la rizósfera y con frecuencia juega un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas.

Otro mecanismo que influye positivamente en el crecimiento de las plantas es la producción de la enzima, 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC). Esta enzima juega un papel importante en la regulación de la hormona vegetal, etileno.

Los microorganismos que sintetizan ACC desaminasa pueden, en parte, disminuir el impacto negativo ocasionado por la producción de etileno inducido por estrés.

Al igual que por muchos otros factores bióticos y abióticos, la producción acelerada de etileno se ha registrado por bajas y altas temperaturas tanto en los tejidos de las plantas como en las especies microbianas de la rizósfera.

Una bacteria psicrotolerante que produce ACC desaminasa es *P. putida* UW4. Se ha reportado que tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal de canola a baja temperatura en condiciones de estrés salino (Cheng, *et al.*, 2007).

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y es necesario para el crecimiento de casi todas las formas de vida (Howard 1999). Sin embargo, su disponibilidad para los organismos es muy limitada debido a la rápida oxidación del estado ferroso (Fe^{++}) para férrico (Fe^{+++}). El ion férrico es muy insoluble en condiciones fisiológicas y hace que su adquisición por microorganismos sea un reto considerable (Neilands., 1995).

Los microorganismos han desarrollado mecanismos especializados para la asimilación de hierro, incluyendo la producción de compuestos quelantes de bajo peso molecular, conocidos como sideróforos, que transportan este elemento en sus células. Los sideróforos producidos por microorganismos de la rizósfera han sido implicados en la mejora directa e indirecta del crecimiento de las plantas (Neilands., 1981).

Los sideróforos también proporcionan una ventaja en la supervivencia de las plantas y bacterias de la rizósfera, ya que son capaces de limitar el crecimiento de patógenos fúngicos

y otros competidores microbianos por la reducción en la disponibilidad de hierro para su supervivencia (Masalha, *et al.* 2000; Wang, *et al.* 2000).

El papel de los sideróforos en el control biológico de patógenos de plantas fue primeramente demostrado con Pseudobactin, un sideróforo producido por *Pseudomonas* de la cepa B10 (Kloepper, *et al.*, 1980)

Una mutante tolerante al frío de *Pseudomonas fluorescens* con un aumento de 17 veces en la producción de sideróforos reportada por Katiyar y Goel (2004), promovió el crecimiento de las plantas de *Vigna radiata* a los 25 y 10 °C.

Una faceta importante de la competitividad de un agente de biocontrol es su capacidad para persistir y proliferar. Sin embargo, a menudo es difícil predecir el comportamiento de los microorganismos en el suelo ya que la persistencia en el suelo de una bacteria puede ser influenciada por un número de diferentes factores, incluyendo la temperatura.

Muchos fitopatógenos fúngicos son más dañinos cuando la temperatura del suelo es baja, por lo tanto, es razonable esperar que los agentes de control biológico también sean tolerantes al frío. McBeath (1995), informó del aislamiento de varias cepas de *Trichoderma sp.*, capaces de actuar como agentes de biocontrol a bajas temperaturas (es decir, 4 a 10 °C) contra una gama de diferentes hongos patógenos.

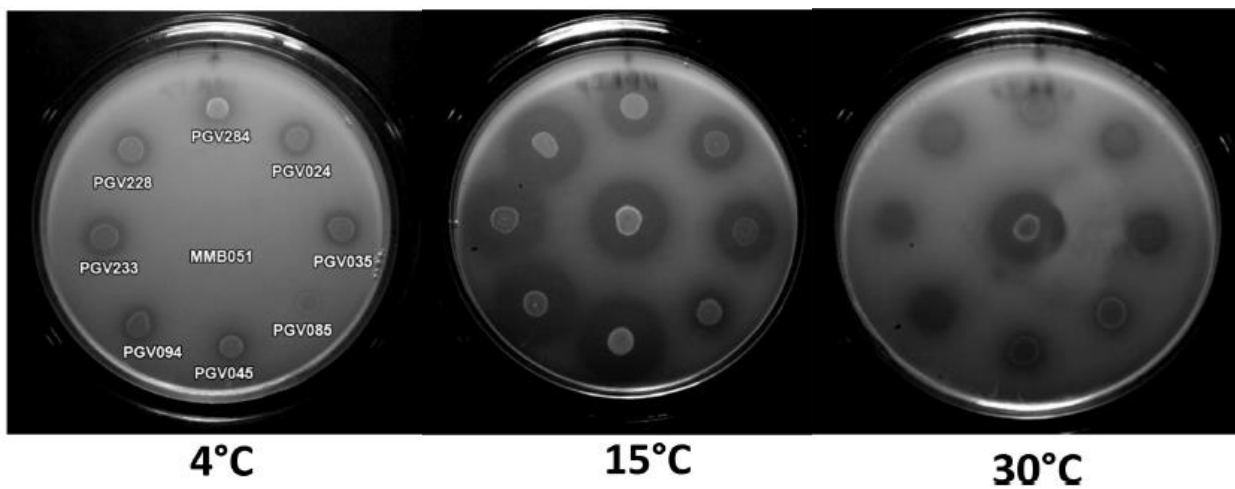
En este sentido, *Exiguobacterium acetylicum* cepa 1P fue aislada de un suelo de gran altitud en el noreste del Himalaya indio. Esta bacteria tuvo la capacidad para producir sideróforos a los 4 °C e inhibió el crecimiento y desarrollo de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* y *Fusarium oxysporium* en condiciones in vitro y en cultivos de café (Selvakumar *et al.*, 2009).

Entre los datos más recientes, se encuentra un trabajo realizado por Balcázar y colaboradores en 2015, donde se hizo una prospección de microorganismo promotores del crecimiento de las plantas, aislados de dos glaciares venezolanos: Pico Bolívar y Pico Humboldt. Los PGP mostraron capacidad para producir fitohormonas y ácido cianhídrico (HCN), para excretar sideróforos e inhibir fitopatógenos Figura 6. El análisis de la secuencia nucleotídica de los genes 16S rRNA de los microorganismos aislados les permitió clasificarlos en el género *Pseudomonas*.

Actualmente, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que habitan la rizósfera y muy poco se sabe de levaduras que presenten propiedades similares a estas.

En el 2016, Fu y colaboradores evaluaron las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de varias cepas de levaduras aisladas de la rizósfera y filósfera (parte aérea de las plantas) de *Drosera spatulata* y el efecto de la inoculación de dichas cepas sobre plantas de *Nicotiana bentamiana* Figura 7.

Prueba de solubilización de fosfatos mediado por bacterias psicrotolerantes.



Prueba de inhibición de hongos fitopatógenos

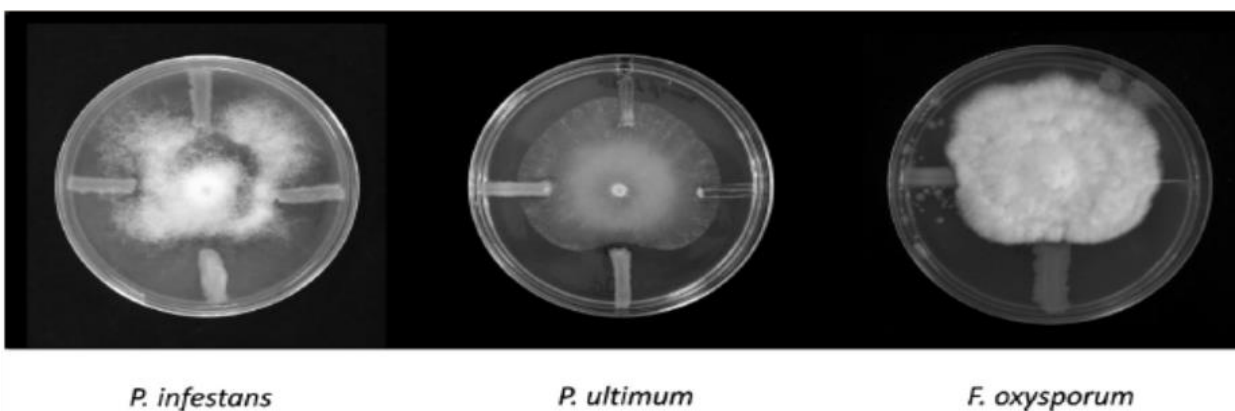


Figura 6. Caracterización de bacterias aisladas del glaciar Pico Bolívar. La imagen superior corresponde a la prueba de solubilización de fosfatos (fosfato tricálcico), clasificada como uno de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal; Imagen inferior, correspondiente a la prueba de inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum* y *Fusarium oxysporum*. (Tomado de Balcázar, *et al.* 2015)

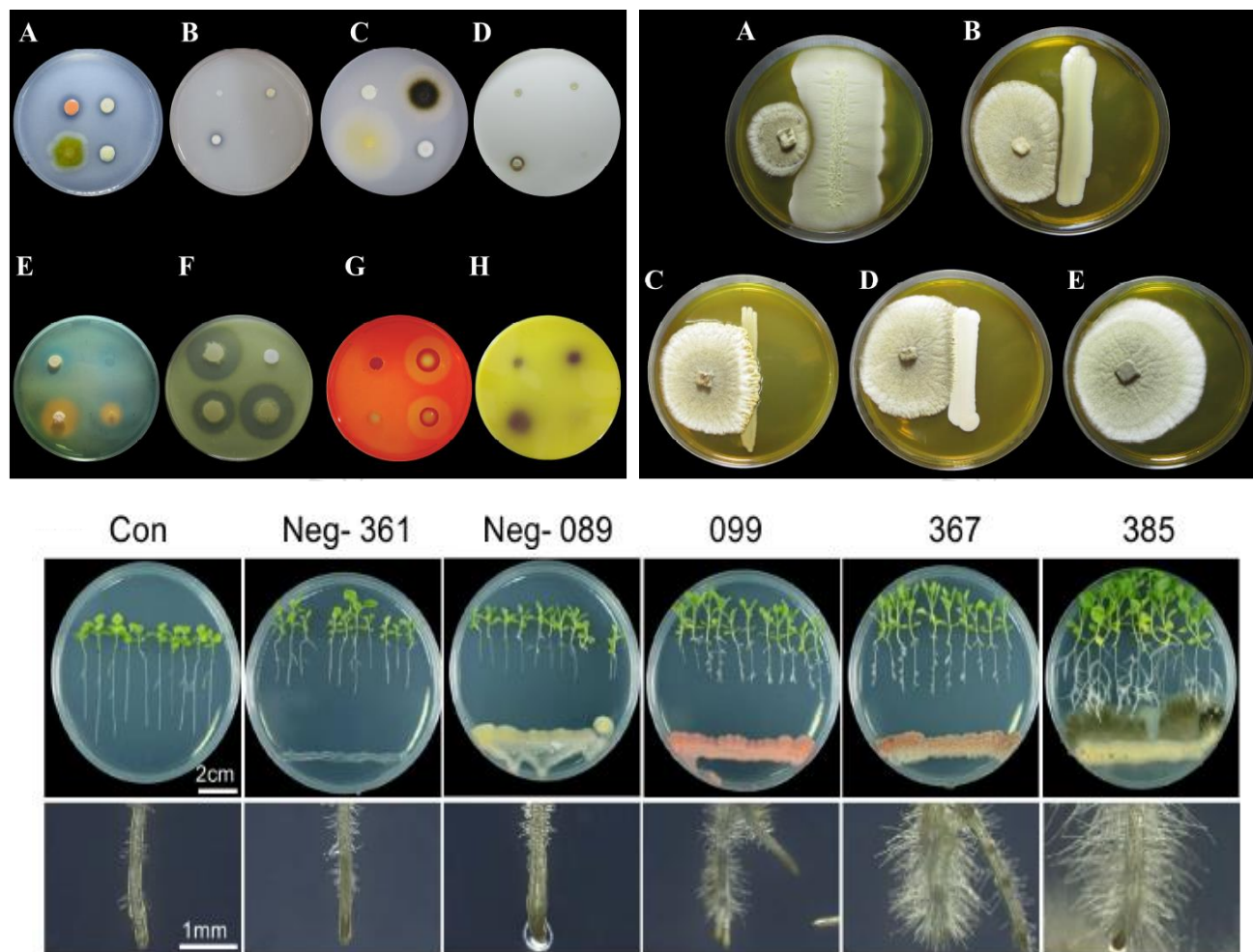


Figura 7. Evaluación de la promoción del crecimiento mediado por levaduras provenientes de la filósfera de *Drosera spatulata*; 1) Conjunto de pruebas bioquímicas cualitativas: A-D) Evaluación de la solubilización de fósforo sobre varias fuentes de fósforo inorgánico., E) Prueba de producción de sideróforos., F) producción de proteasas, G) Producción de celulasas., H) Producción de quitinasas; 2) Prueba de control biológico., A-D) Confrontación de varias cepas de levadura contra *Glomerella cingulata*., E) Crecimiento control de *Glomerella cingulata*; 3) Efectos sobre plantas de *N. benthamiana* por coinoculación con varias cepas de levadura. (Tomado de Fu, *et al.* 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos de la rizósfera, se han convertido en objeto de gran interés como alternativa de los fertilizantes químicos en la agricultura sustentable (Deepak, *et al.*, 2014).

Se han reportado microorganismos tolerantes al frío capaces de fijar de nitrógeno, promover el crecimiento vegetal, y contrarrestar el estrés por frío en las plantas.

La mayoría de las investigaciones realizadas hasta el momento se ha centrado en gran medida en bacterias y hongos micorrízicos capaces de promover el crecimiento en plantas, y se sabe muy poco sobre el uso de levaduras como agentes promotores del crecimiento vegetal.

Menos aún, se conocen levaduras promotoras del crecimiento vegetal capaces de tolerar bajas temperaturas y desempeñar sus funciones biofertilizantes en estas condiciones.

La caracterización de levaduras y bacterias psicrófilas / psicrotolerantes capaces de promover el crecimiento vegetal sería una aportación importante para el desarrollo de inoculantes activos en frío que satisfagan las necesidades agrícolas de cultivos templados y fríos y sean capaces de contrarrestar los efectos adversos que las bajas temperaturas generan sobre los cultivos cálidos.

El volcán Xinantécatl es considerado uno de los sitios periglaciares más importantes del país. Las bajas temperaturas y los periodos de congelación y descongelación que dan como resultado la aparición de pequeñas plantas tolerantes al frío lo hacen un sitio prometedor para prospectar microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

Solanum lycopersicum es una planta de importancia económica y alimenticia a nivel mundial. A bajas temperaturas muestra alteraciones en su desarrollo y fenotipo, por lo que sería un buen modelo para probar las cepas psicrófilas/spicrotolerantes, tanto para determinar sus características promotoras del crecimiento vegetal, como para ver el efecto que pudieran tener al revertir o amortiguar el estrés por frío.

4. HIPÓTESIS

La inoculación con microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes promotores del crecimiento vegetal mejorará el crecimiento y desarrollo de plantas de jitomate y amortiguará los daños causados por estrés biótico y abiótico.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtener cepas de microorganismos psicrófilos y/o psicrotolerantes con características promotoras del crecimiento vegetal y probar su efecto sobre plantas de jitomate.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y caracterizar cepas de levaduras y bacterias psicrófilas y psicrotolerantes a partir de muestras de rizosfera de plantas que crecen en el volcán Xinantécatl.
- Seleccionar a las mejores cepas promotoras del crecimiento vegetal con base en pruebas bioquímicas cualitativas de mecanismos directos e indirectos, así como de pruebas *in vitro* de germinación y de promoción del crecimiento de plántulas de jitomate.
- Demostrar el efecto promotor del crecimiento de las cepas de bacterias y levaduras de manera independiente sobre plantas de jitomate en condiciones de baja temperatura.
- Evaluar el efecto de la inoculación de plantas de jitomate con las cepas psicrófilas y psicrotolerantes frente estrés por frío.
- Seleccionar cepas capaces de actuar como potenciales agentes de control biológico de hongos patógenos de plantas de jitomate.

CAPITULO II

7. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

7.1 Prospección de microorganismos.

La búsqueda de microorganismos se planteó a realizar en un ambiente, donde numerosas situaciones extremas, incluyendo bajas temperaturas con ciclos frecuentes de congelación y descongelación, altas concentraciones de sal, bajo contenido de humedad, radiación ultravioleta y radiación solar intensa, así como la baja disponibilidad de nutrientes nos aseguraran las características extremófilas de nuestros microorganismos blanco. El sitio que cumplió con varias de esas características, fue el volcán Xinantécatl.

7.1.1 Aislamiento de microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes a partir de suelo rizosférico.

Se tomaron 3 muestras de rizosfera de plantas nativas del volcán Xinantécatl, situadas en diferentes puntos de la zona del cráter (P1, P2 y P3) y una muestra de suelo nevado (N).

La primera planta muestreada (P1) corresponde a un ejemplar del género *Arenaria*, localizada en la región del “ombligo” entre los lagos del Sol y la Luna. La planta se encontraba creciendo en un suelo arenoso, poco compacto, sin daños fisiológicos aparentes. Su coloración era verde brillante y raíces abundantes. Fig. 8. La segunda planta pertenece al género *Sisyrinchium*, y se encontraba creciendo en sustrato arcilloso, sobresaliendo entre un montículo de nieve, localizada en las faldas del pico del Fraile. Del mismo sitio, a una distancia de 40 cm aproximadamente se tomó una muestra de nieve (N) 5 cm debajo de la superficie. La planta 3 (P3) fue colectada en la cima del pico del Fraile frente a la laguna del Sol. Esta planta también se encontraba creciendo en un montículo de nieve, enraizada en sustrato arcilloso, este ejemplar corresponde al género *Draba*. Figura 8.

Para aislar microorganismos a partir de las muestras, se cortaron y pesaron 100 mg de raíz de cada planta (P1, P2 y P3) y se lavaron con agua destilada estéril. Inmediatamente, se inocularon cajas de medio Sabouraud agar y Agar Dextrosa Papa (PDA) suplementados con cloranfenicol 50 mg/ml y ampicilina 100 mg/ml con diferentes diluciones de la solución obtenida del lavado: Directo, 1:10 y 1:100. (el objetivo inicial era aislar preferentemente levaduras y hongos filamentosos por eso se seleccionaron esos medios de cultivo).

Las bacterias aisladas se obtuvieron al sembrar las soluciones de lavado antes mencionadas en placas de PDA sin antibióticos. Los aislados de la muestra de nieve (N) se obtuvieron al sembrar 50 µL directos de nieve derretida.

La incubación de las cajas se hizo a 30 y 4 °C durante 7 días.

Se obtuvieron 265 colonias totales, de las que se seleccionaron 12. Éstas se aislaron en cajas nuevas de medio de cultivo sólido con y sin antibióticos.

Los 12 aislados fueron analizados en microscopio de campo claro y esto permitió clasificar por tamaño y morfología en 4 cepas bacterianas y 8 cepas levaduriformes. Figura 9.

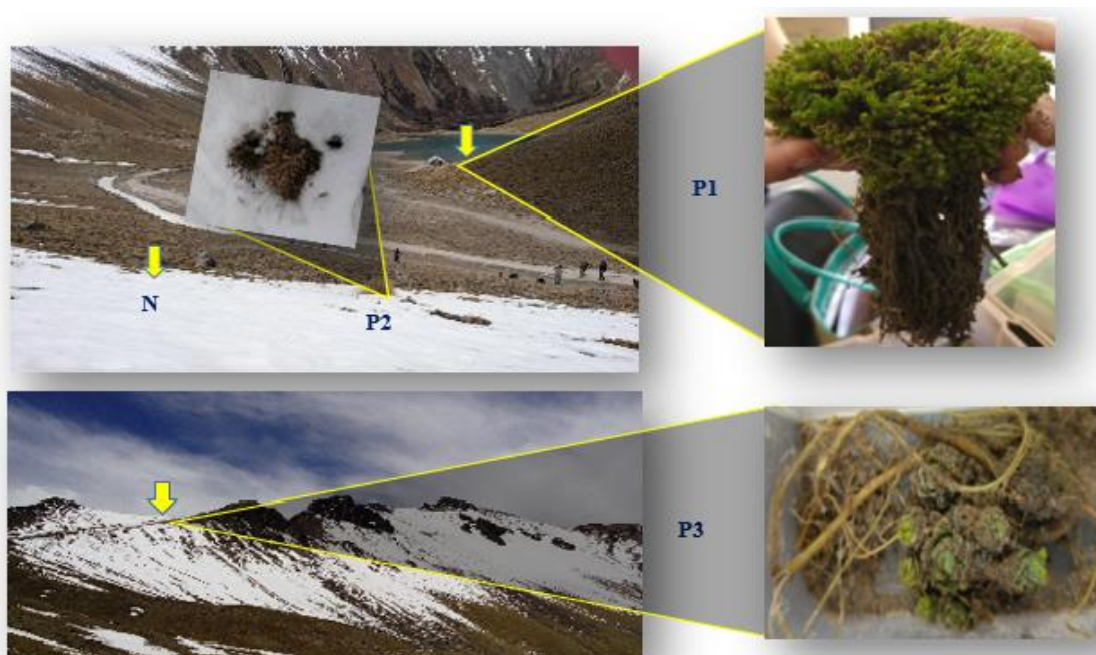


Figura 8. Zona del cráter del volcán Xinantécatl; Sitios de muestreo P1, P2, P3, lugares donde se encontraban creciendo las plantas de donde se tomó la muestra de suelo rizosférico. y N, sitio donde se colectó la muestra de nieve.

Las bacterias y levaduras fueron nombradas con un código correspondiente al género al que pertenecen (ver apartado de identificación molecular), por lo tanto, se enlistan de la siguiente manera:

Tabla 1. Lista de códigos de identificación y sitio de muestreo del que provienen las cepas de levaduras y bacterias aisladas del volcán Xinantécatl.

| CÓDIGO CLAVE | SITIO DE AISLAMIENTO |
|------------------|--------------------------------|
| LEVADURAS | |
| Rh1 | P1 (<i>Arenaria</i> sp.) |
| Rh2 | P1 (<i>Arenaria</i> sp.) |
| Rh3 | P1 (<i>Arenaria</i> sp.) |
| Rh4 | P1 (<i>Arenaria</i> sp.) |
| Ng1 | P1 (<i>Arenaria</i> sp.) |
| Mr1 | P3 (<i>Draba</i> sp.) |
| Mr2 | P3 (<i>Draba</i> sp.) |
| Mr3 | P3 (<i>Draba</i> sp.) |
| BACTERIAS | |
| Ps1 | P2 (<i>Sisyrrinchium</i> sp.) |
| Ps2 | P2 (<i>Sisyrrinchium</i> sp.) |
| Ps3 | P2 (<i>Sisyrrinchium</i> sp.) |
| Ps4 | N (suelo nevado) |

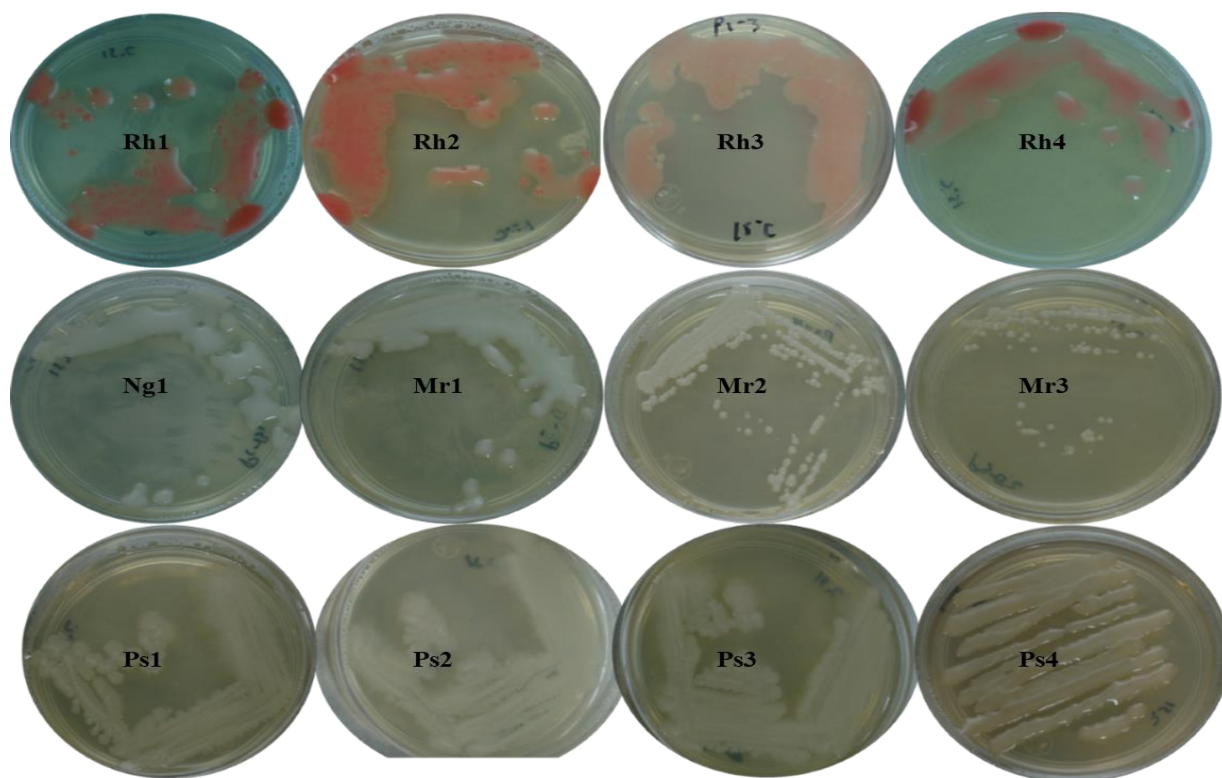


Figura 9. Fotografías de los 12 aislados del volcán Xinantécatl, creciendo en medio de cultivo PDA, creciendo a 15 °C por 72 horas.

7.2 Identificación molecular.

Para llevar a cabo la identificación de las levaduras aisladas, se extrajo el ADN genómico por el protocolo reportado por Harju y colaboradores en el 2004. A partir de un cultivo líquido de YPD inoculado con las cepas, incubado a 15 °C durante 48 horas, se obtuvo un paquete celular por centrifugación (10000 rpm), durante 10 minutos.

Las células se resuspendieron en 200 µl de buffer de lisis (2% de Tritón X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8) y 1 mM de EDTA (pH 8)). La suspensión celular se congeló con nitrógeno líquido y se pasó inmediatamente a un baño a 95 °C por un minuto. Este procedimiento se repitió un par de veces más. Posteriormente, el material celular se resuspendió vigorosamente con ayuda de un vortex durante 30 segundos. Se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó una vez más durante 2 minutos. La solución se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente a 13,000 rpm.

La fase acuosa se transfirió a un tubo que contenía 400 µl de etanol absoluto frío. Las muestras se dejaron precipitar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se decantó.

La pastilla del ADN se lavó con etanol al 70% y se dejó secar por algunos minutos a 60° C. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua destilada estéril.

A partir del ADN purificado, se amplificó la región ITS3-ITS4 (Internal Transcribed Spacer) y LSU (large subunit 25-28S RNA) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos: ITS3 5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'; ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' (White *et al.*, 1990). LRoR 5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3', LR5 5' TCCTGAGGGAACTTCG 3'. El fragmento amplificado es de ~420 pares de bases (pb) y ~900 pb, respectivamente. El programa de PCR utilizado en ambos casos fue el siguiente: 94 °C- 5 min (1 ciclo); 94 °C- 45 s, 54 °C -45 s y 72 °C - 1.5 min por 30 ciclos y; 72 °C - 10 min (1 ciclo);

La extracción del ADN genómico de las bacterias se hizo de acuerdo al protocolo de Sambrook, et al., 1989, con algunas modificaciones.

A partir de un cultivo de 5 ml en medio LB, crecido durante 48 horas, se obtuvo el paquete celular en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, por precipitación por centrifugación a 6,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 1.5 minutos. El paquete celular se resuspendió en buffer 450 µl de TE (Tris 50 mM-EDTA 20mM). A la mezcla se agregaron 50 µl de proteinasa K 10 mg por ml y se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

50 µl de SDS 10% fueron agregados a la mezcla de reacción. Se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Aquí mismo, se agregaron 100 µl de solución de NaCl 5M, se mezcló e incubó durante 10 minutos a 65 °C. A la misma mezcla, se le adicionaron 80 µl de CTAB/NaCl (precalentado a 65 °C) y se incubó durante 15 minutos a 65 °C.

La mezcla de reacción se centrifugó a 12, 000 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 50 µl de RNAsa al 10% y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Para la extracción y lavado del DNA se adicionaron 300 µl de solución de fenol- cloroformo-isoamílico, se mezcló por inversión suave y se centrifugó a 10, 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionaron 300 µl de cloroformo- alcohol isoamílico y se mezcló por agitación durante 40 segundos. Se centrifugó a 10, 000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo.

El ADN se precipitó al agregar 0.6 volúmenes de isopropanol, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugación a 10, 000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvo una pastilla y el sobrenadante fue decantado. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se recuperó por centrifugación a 10, 000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó a 37 °C durante 15 minutos.

El material genético se resuspendió en agua destilada libre de nucleasas y se utilizó como molde para la amplificación del gen ribosomal 16s por la técnica de PCR, con ayuda de los oligonucleótidos rD1 5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3' y fD1 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', de acuerdo a las condiciones descritas por Weisburg et al. (1991) para amplificar un fragemento de ~450 pb.. El programa de PCR utilizado en este caso fue el siguiente: 94 °C- 5 min (1 ciclo); 94 °C- 45 s, 54 °C -45 s y 72 °C - 1 min por 30 ciclos y; 72 °C - 10 min (1 ciclo). El producto de la amplificación se purificó por con el GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) y se mandó a secuenciar con los mismos

oligonucleótidos, en ambos sentidos, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Ibt- UNAM). Las secuencias se muestran en el anexo 1 y 2.

La identidad de las cepas se determinó por alineamiento de secuencias usando el programa BLAST de la base de datos de GenBank.

La aproximación de la identidad de las 12 cepas se enlista en la siguiente tabla y se hace una comparación entre parientes cercanos, según el marcador con el que se haya hecho el alineamiento (ITS o LSU), en el caso de las levaduras., Tabla 2 A-B.

Con las secuencias de los marcadores ITS3-4 para levaduras y 16s para bacterias, se construyeron árboles filogenéticos utilizando la plataforma de inferencia filogenética SeaView (Gouy et al., 2010), siguiendo un enfoque de máxima verosimilitud (Guindon et al., 2010). Con ayuda de Blastn se seleccionaron secuencias homólogas a partir de un conjunto de secuencias de ARN de referencia del NCBI (refseq_rna) y Colección de nucleótidos (nr / nt). Los alineamientos se curaron manualmente con ayuda del programa Gblocks (Talavera y Castresana, 2007), y luego se analizaron juntas para inferir la filogenia. La matriz de datos de secuencias de ADN se envió al servidor Smart Model Selection (SMS) para predecir un modelo de sustitución adecuado, cumpliendo con los parámetros del Criterio de información de Akaike (AIC) (Lefort et al., 2017). Se seleccionaron los modelos evolutivos HKY85 (para levadura) y TN93 (para bacterias) (Lefort et al., 2017). El soporte de rama se evaluó de acuerdo con el algoritmo aLTR (SH-Like). Finalmente, el árbol se detalló gráficamente en la aplicación Java FigTree v1.4.4. Figura 10 y 11.

Tabla 2-A. Identificación de parientes cercanos a través del alineamiento de secuencias por BLASTN, de los marcadores moleculares amplificados de las levaduras aisladas del volcán Xinantécatl.

| LEVADURAS. Alineamiento en GenBank | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------|-----------------------------|--|-------------------------|-------------|
| Códigos de identificación | ITS3-4 | | | | LSU | | |
| | Parientes cercanos (géneros) | Porcentaje de identidad | Query cover | Número de acceso a GeneBank | Parientes cercanos (géneros) | Porcentaje de identidad | Query cover |
| Rh1 | <i>Rhodotorula mucilaginosa.</i> | 100.00 | 100 | MN176371 | <i>Rhodotorula mucilaginosa.</i> | 96.57 | 97 |
| Rh2 | <i>Rhodotorula</i> sp. | 100.00 | 100 | MN176372 | <i>Rhodotorula mucilaginosa.</i> | 99.88 | 99 |
| Rh3 | <i>Rhodotorula</i> sp. | 100.00 | 100 | MN176373 | <i>Rhodotorula mucilaginosa.</i> | 98.95 | 99 |
| Rh4 | <i>Rhodotorula</i> sp. | 98.92 | 100 | MN176374 | <i>Rhodotorula</i> sp. | 100.00 | 99 |
| Ng1 | <i>Naganishia</i> sp. | 100.00 | 100 | MN176375 | <i>Naganishia diffluens.</i> | 99.77 | 99 |
| Mr1 | <i>Mrakia</i> sp. | 100.00 | 100 | MN176376 | <i>Mrakia gelida</i> / <i>Mrakia frigida</i> | 98.98 | 99 |
| Mr2 | <i>Mrakia aquatica.</i> | 98.38 | 99 | MN176377 | <i>Mrakia aquatica.</i> | 99.55 | 99 |
| Mr3 | <i>Mrakia aquatica.</i> | 98.37 | 99 | MN176378 | <i>Mrakia aquatica.</i> | 99.45 | 99 |

Tabla 2-B. Identificación de parientes cercanos a través del alineamiento de secuencias (BLASTN) del marcador molecular 16s de las bacterias aisladas del volcán Xinantécatl.

| Códigos de identificación | BACTERIAS (marcador 16s). Alineamiento en GenBank | | | |
|---------------------------|--|-------------------------|-------------|-----------------------------|
| | Parientes cercanos (géneros) | Porcentaje de identidad | Query cover | Número de acceso a GeneBank |
| Ps1 | <i>Pseudomonas fluorescens.</i> | 99.74% | 99% | MN176384 |
| Ps2 | <i>Pseudomonas fluorescens.</i> | 99.74% | 99% | MN176385 |
| Ps3 | <i>Pseudomonas silesiensis.</i> | 99.22% | 98% | MN176386 |
| Ps4 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 98.99% | 99% | MN176387 |

Las filogenias permitieron confirmar el género correspondiente de cada uno de los aislados, señalando que las cepas de levaduras Rh1-Rh4 corresponden al género *Rhodotorula*, Ng1 es miembro del género *Naganishia* y Mr1-Mr3 son parte del género *Mrakia*, mientras que los cuatro aislados bacterianos corresponden al género *Pseudomonas*.

Para descartar o confirmar la idea de que se trataran de la misma especie entre las cepas correspondientes al mismo género, se hicieron alineamientos de secuencias entre ellas, de cada uno de los marcadores amplificados.

El marcador LSU mostró mayores diferencias en secuencia dado que la secuencia analizada es más grande, indicando menores porcentajes de identidad entre cepas. Sin embargo, presumiblemente, las cepas Mr2 y Mr3 si correspondan a la misma especie, ya que en la región analizada de 900 pares de bases (pb), solo mostraron un cambio.

Por otro lado, las bacterias de las cepas Ps2 y Ps3 mostraron 100% de identidad entre ellas, cuando se alinearon las regiones 16s, por lo que se puede decir casi con seguridad que se trata de la misma especie, sin embargo, la región 16s que se logró amplificar fue de 385 pb. Valdría la pena confirmar la identidad con una región más larga. Un cuadro comparativo de los porcentajes de identidad entre cepas se muestra en el anexo 3.

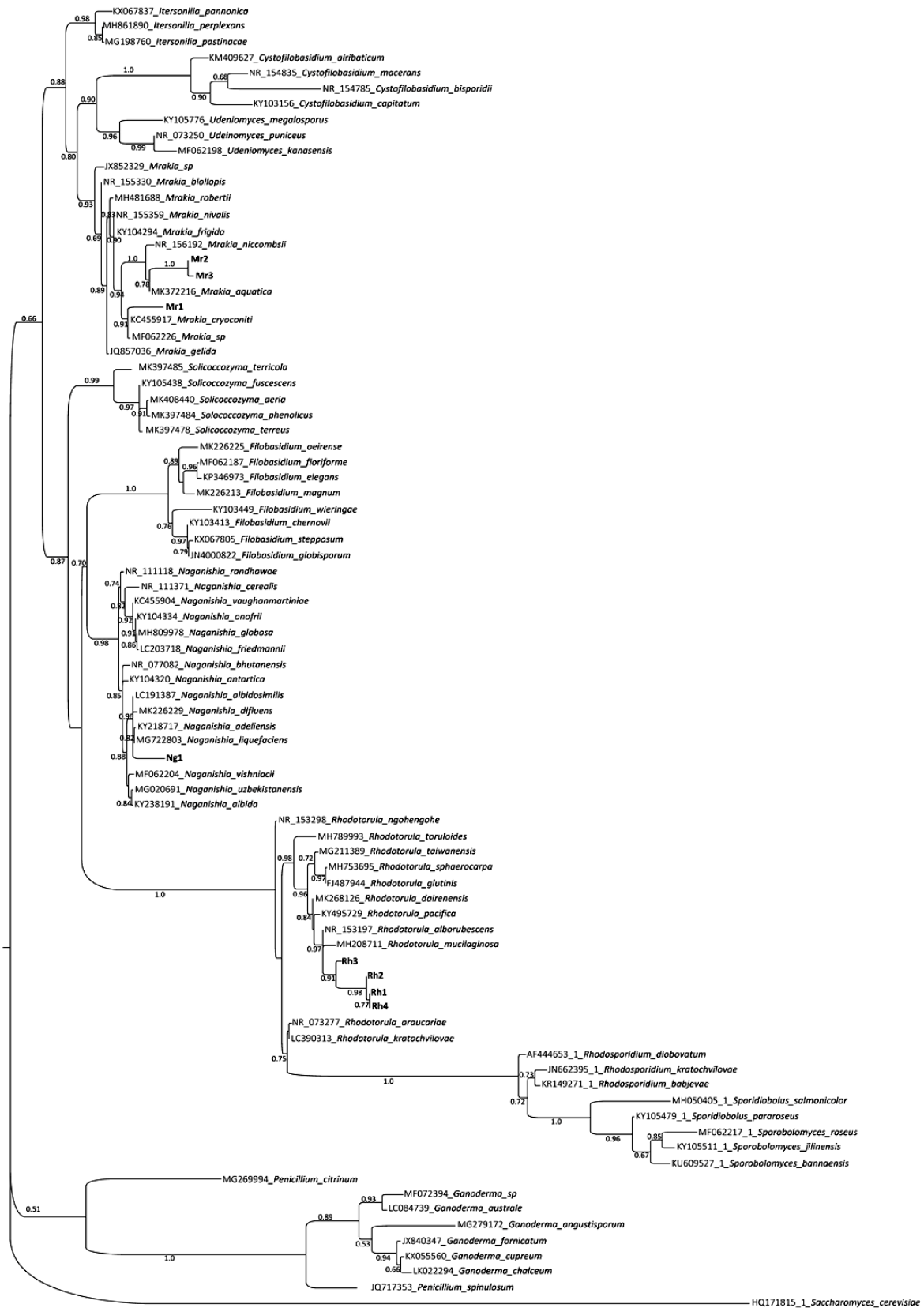


Figura 10. Árbol filogenético de levaduras. Inferencia filogenética realizada con el marcador molecular ITS 3-4, con el modelo evolutivo HKY85. Se muestran ramas con soportes mayores a 0.5.

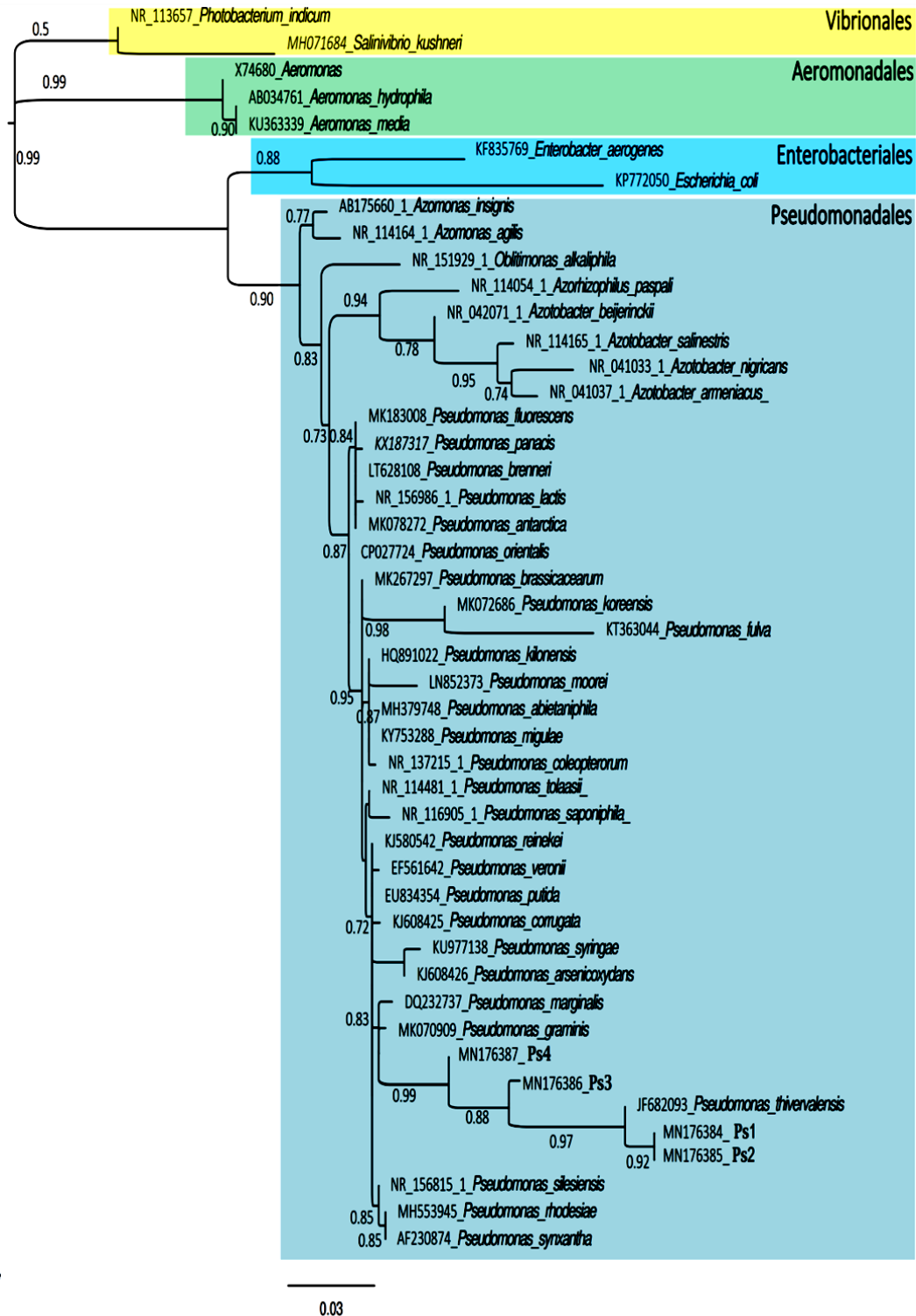


Figura 11. Árbol filogenético de bacterias. Inferencia filogenética realizada con el marcador molecular 16s, con el modelo evolutivo TN93. Se muestran ramas con soportes mayores a 0.5.

7.3 Caracterización general de los microorganismos aislados.

El cultivo de los microorganismos en diferentes medios de cultivo permitió detectar las características más frecuentes y generales de cada uno de los aislados.

Las 12 cepas analizadas, fueron sembradas en medio de cultivo Agar Sabouraud, PDA, YPD y LB., con incubación a 4, 15 y 28 ± 2 °C.

Las características fueron muy similares entre cada cultivo, siendo de manera general, las que se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Características generales de los microorganismos aislados del volcán, Nevado de Toluca.

| Levaduras | Rango de tolerancia de temperatura (°C) | Temperatura óptima de crecimiento | Color | Apariencia | Textura | Borde | Elevación |
|------------------|---|-----------------------------------|--------------|------------|---------|---------|-----------|
| Rh1 | 3-37 | 28° C | Rosa-naranja | Brillante | Mucosa | Entero | Convexo |
| Rh2 | 3-37 | 28° C | Rosa-naranja | Brillante | Mucosa | Entero | Convexo |
| Rh3 | 3-37 | 28° C | Rosa-naranja | Brillante | Mucosa | Entero | Convexo |
| Rh4 | 3-37 | 28° C | Rosa-naranja | Brillante | Mucosa | Entero | Convexo |
| Ng1 | 3-37 | 28° C | Blanco | Mate | Cremosa | Entero | Convexo |
| Mr1 | 3-30 | 3-15° C * | Beige | Brillante | Mucosa | Entero | Convexo |
| Mr2 | 3-30 | 15° C | Beige | Mate | Cremosa | Entero | Convexo |
| Mr3 | 3-30 | 15° C | Beige | Mate | Cremosa | Entero | Convexo |
| Bacterias | | | | | | | |
| Ps1 | 3-30 | 28° C | Amarillo | Mate | Viscosa | Ondular | Elevado |
| Ps2 | 3-30 | 28° C | Amarillo | Mate | Viscosa | Ondular | Elevado |
| Ps3 | 3-30 | 28° C | Amarillo | Mate | Viscosa | Ondular | Elevado |
| Ps4 | 3-30 | 30° C | Blanco | Brillante | Mucosa | Entero | Convexo |

7.4 Determinación de psicofilia o psicrotolerancia de las cepas aisladas.

La implementación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal de características psicrófilas o psicrotolerantes en cultivos cálidos resulta controversial al poner en duda las propiedades y supervivencia de los microorganismos en ambientes que pudieran no ser los óptimos para su crecimiento, desarrollo y producción de metabolitos benéficos para las especies vegetales.

Para determinar el rango de temperaturas a las que pueden crecer las cepas aisladas del volcán Xinantécatl y justificar su uso con enfoque en la promoción del crecimiento de plantas de cultivos cálidos, se hicieron experimentos de crecimiento celular en medio líquido y sólido, incubados en diferentes condiciones de temperatura.

La temperatura óptima de crecimiento se determina cuando la tasa de crecimiento es máxima y el tiempo de duplicación (td) es mínimo, permitiendo establecer la tendencia de los microorganismos hacia la psicofilia o psicrotolerancia.

La tasa de crecimiento se determinó a partir del crecimiento de cultivos en medio PDB para levaduras y LB para bacterias. Se partió de un pre inóculo crecido durante 48 horas a 15°C. La densidad óptica (DO) de los cultivos se ajustó a 0.1_{600 nm} y se incubaron a 3 °C (cuarto frío), 15 °C y 28 °C, con agitación de 150 revoluciones por minuto (rpm). Se tomaron muestras a las 0.5, 1, 2, 4 y 8 horas y se leyó la densidad óptica con ayuda de un

espectrofotómetro a 600 nm para cada una de las cepas, por triplicado, a las tres temperaturas. Tabla 4, 5.

La velocidad o tasa de crecimiento (μ) fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\log(X_f) - \log(X_i)}{t_2 - t_1}$$

donde:

μ = tasa o velocidad de crecimiento

$\ln X_2$ = logaritmo natural de la concentración de biomasa final (dada en densidad óptica)

$\ln X_1$ = logaritmo natural de concentración de biomasa inicial

t_2 = tiempo final en horas

t_1 = tiempo inicial en horas

El tiempo de duplicación se calculó a partir de la velocidad de crecimiento, sustituyéndola en la siguiente fórmula.

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

T_d = tiempo de duplicación

$\ln 2$ = logaritmo natural de 2

μ = tasa o velocidad de crecimiento.

Tabla 4. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de levaduras crecidas a temperaturas de 3, 15 y 28 °C

| Cepas | μ (h^{-1}) | | | T _d (horas) | | | |
|------------|--------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|-----------------|
| | 3 °C | 15 °C | 28 °C | 3 °C | 15 °C | 28 °C | |
| Rh1 | 0.9 | 0.16 | 0.23 | 7.62 | 4.17 | 2.95 | Psicrotolerante |
| Rh2 | 0.12 | 0.14 | 0.25 | 5.48 | 4.64 | 2.67 | Psicrotolerante |
| Rh3 | 0.08 | 0.15 | 0.25 | 8.02 | 4.41 | 2.75 | Psicrotolerante |
| Rh4 | 0.12 | 0.17 | 0.17 | 5.87 | 3.88 | 3.88 | Psicrotolerante |
| Ng1 | 0.10 | 0.17 | 0.19 | 6.56 | 3.93 | 3.58 | Psicrotolerante |
| Mr1 | 0.12 | 0.12 | 0.07 | 5.60 | 5.55 | 9.01 | Psicrófila |
| Mr2 | 0.14 | 0.14 | 0.08 | 4.75 | 4.73 | 8.45 | Psicrófila |
| Mr3 | 0.11 | 0.12 | 0.09 | 6.31 | 5.39 | 7.68 | Psicrófila |

Todas las cepas de levaduras crecieron en la temperatura más baja probada (3 °C) y en la más alta (28 °C) esto las posicionaba como potenciales cepas promotoras del crecimiento vegetal que pudieran ser usadas en cultivos fríos y cálidos siempre y cuando, mostraran propiedades adecuadas para ello. Las cepas Rh1, Rh2, Rh3, Ng1, Ps1, Ps2, Ps3 y Ps4 mostraron velocidad de crecimiento mayor a 28 °C, lo que las clasifica como psicrotolerantes, mientras que las

cepas Mr1, Mr2 y Mr3 tuvieron mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación a 15°C, lo que permite clasificarlas como psicrófilas. La cepa Rh4 mantuvo la misma velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación a 15 y 28 °C por lo que es clasificada como psicrotolerante.

Tabla 5. Tiempo de duplicación de bacterias crecidas a 3,15 y28 °C en medio de cultivo LB.

| Cepas | μ (h ⁻¹) | | | Td (horas) | | | |
|-------|--------------------------|------|-------------|------------|------|-------------|-----------------|
| | 3°C | 15°C | 28°C | 3°C | 15°C | 28°C | |
| Ps1 | 0.15 | 0.10 | 0.35 | 6.37 | 4.50 | 1.97 | Psicrotolerante |
| Ps2 | 0.08 | 0.15 | 0.35 | 8.31 | 4.44 | 1.93 | Psicrotolerante |
| Ps3 | 0.08 | 0.15 | 0.24 | 8.54 | 4.56 | 2.86 | Psicrotolerante |
| Ps4 | 0.15 | 0.17 | 0.30 | 4.55 | 3.90 | 2.25 | Psicrotolerante |

El crecimiento de las levaduras también fue evaluado por crecimiento en placa, sobre medio sólido (PDA), inoculado con 10 μ L de cultivo líquido (PDB) ajustados a DO de 0.2_{600nm}, de cada una de las cepas, de manera independiente, con incubación a 2, 4, 10, 15, 20, 23, 28 y 37 °C, monitoreado durante 10 días. En la figura 12, se muestra el crecimiento al día 5, de las 8 cepas de levadura en diferentes temperaturas.

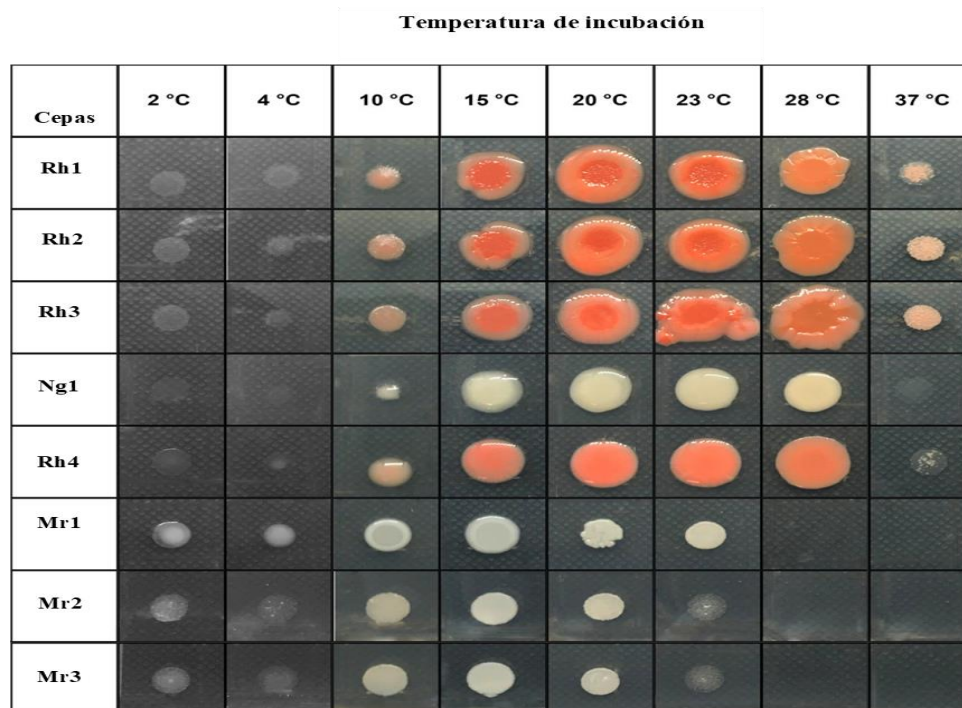


Figura 12. Crecimiento de las levaduras aisladas del volcán Xinantécatl, a diferentes temperaturas. Sobre medio de cultivo PDA. Fotografías tomadas a las 120 horas posteriores a la inoculación del medio.

7.5 Promoción del crecimiento vegetal

7.5.1 Caracterización bioquímica

A cada una de las cepas aisladas, se les hicieron pruebas bioquímicas cualitativas para determinar si presentaban características promotoras de crecimiento vegetal. Las pruebas realizadas fueron: Prueba de solubilización de fosfatos, producción de ácido indol acético, producción de sideróforos y actividad de proteínas remodeladoras de pared celular, CMCasas, xilanasas, quitinasas, proteasas. Cada una de las pruebas se hizo por triplicados en tres condiciones de temperatura: 4 °C, 15 °C y 30 ± 2 °C. (figuras 13-17)

La inoculación de cada una de las pruebas se hizo con cultivos ajustados a DO₆₀₀ nm de 0.2, a partir de pre inóculos crecidos en medio de cultivo YPD para levaduras y LB para bacterias, incubados a 15 °C durante 48 horas. Para ajustar los cultivos, se concentró el paquete celular por centrifugación a 12, 000 rpm. El paquete celular fue lavado con agua destilada estéril en tres ocasiones y resuspendido en agua destilada estéril.

Se hizo un mapa de calor para representar los resultados obtenidos en cada una de las pruebas, a partir de una matriz que asignaba un valor dependiendo si se trataba de resultados claramente positivos, ligeramente positivos o negativos. Esta representación esquemática se hizo en la plataforma online Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/>). Figura 17.

Solubilización de fosfatos

Los fosfatos insolubles, que no pueden ser asimilados por las plantas, pueden ser llevados a formas solubles por la acción de muchos microorganismos. La vía principal de solubilización es mediante la producción de ácidos orgánicos tales como: acético, láctico, oxálico, cítrico, butírico, succínico, málico, glucónico, fumárico y 2-cetoglucónico (Khan *et al.*, 2009; Fender *et al.*, 2012).

La prueba cualitativa de solubilización de fosfatos se basó en un protocolo publicado por Nguyen C. y colaboradores en 1992 con algunas modificaciones. La metodología consiste en sembrar los microorganismos en un medio enriquecido con una fuente de fosfato inorgánico y un indicador de pH.

La determinación de los microorganismos capaces de solubilizar fosfatos fue por aparición de halos de color diferente al indicador de pH que sugiere la acidificación del medio por la liberación de los ácidos orgánicos.

Con 5 µl de cada cultivo ajustado, se inocularon placas con medio NBRIP enriquecido con fosfato tricálcico al 0.5% y 0.25g /L de colorante rojo Congo como indicador de pH.

Todas las bacterias y las levaduras del género *Mrakia*, mostraron halos de solubilización, cuando la prueba fue incubada a 4 y 15 °C. Solo la cepa Ps4, mostró la misma característica a 30 °C. Figura 13.

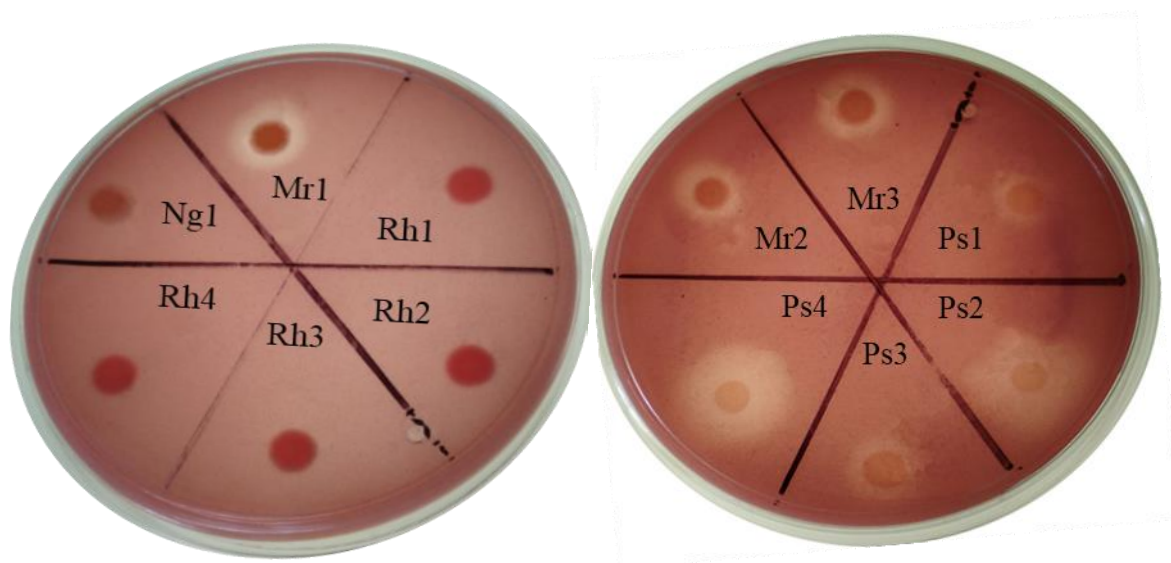


Figura 13. Prueba de solubilización de fosfatos. Los 12 aislados del volcán Xinantécatl creciendo sobre medio NBRIP y rojo Congo, adicionado con fosfato tricálcico, incubado a 15°C.

Prueba de producción de Ácido Indol Acético (IAA)

La producción de IAA por las cepas en cuestión, tanto de levaduras como de bacterias, se determinó siguiendo la metodología descrita a continuación, modificada de la reportada por Ignatova y colaboradores en 2015.

Los microorganismos aislados se cultivaron en medio líquido PDB pH 5.6 suplementado con 400 y 1000 µg de L- triptófano y como tratamiento control, se consideró medio PDB sin triptófano.

Los cultivos fueron incubados a 4, 15 y 30 °C durante 5 días.

Posteriormente, se tomó 1 ml de cada cultivo y se centrifugó a 8 000 g por 5 minutos. Se tomaron 0.5 ml de sobrenadante y se mezcló con 0.5 ml del reactivo de Salkowski (2 ml de 0.5 M de FeCl₃ y 98 ml de H₂SO₄ al 38%).

Después se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La aparición de color rojo, indicaba que el resultado era positivo. Figura 14 A.

La cuantificación de IAA producido por cada cepa se determinó por la intensidad de color que fue medida a una longitud de onda de 530 nm, utilizando un espectrofotómetro de microplaca Epoch (BioTek). Para ellos, se realizó una curva de calibración con IAA estándar (Catálogo Sigma No. 6505-45-9). Figura 14 B.

Tres cepas mostraron resultados positivos superiores al resto de los tratamientos: Rh1, Rh2, Ps4.

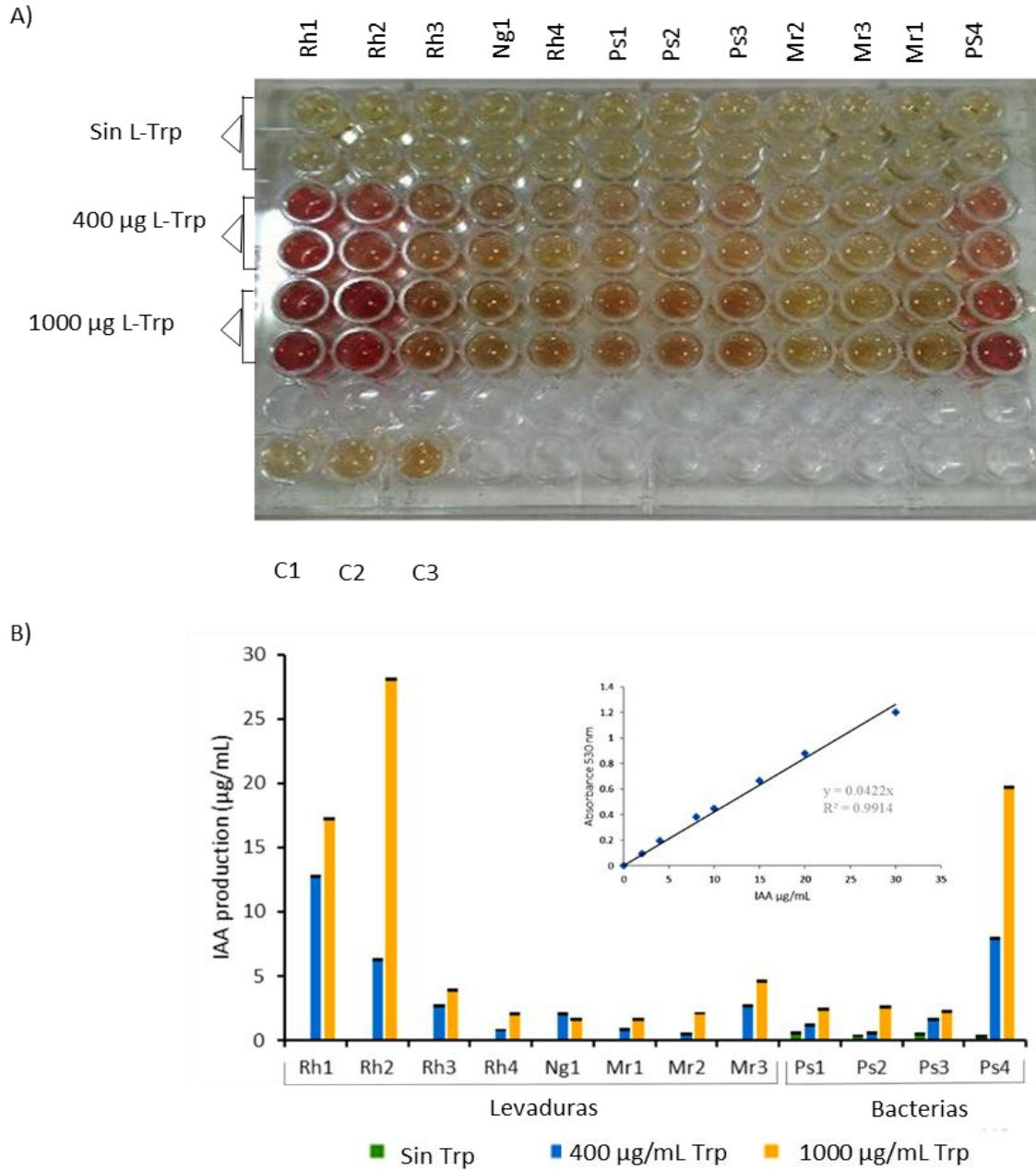


Figura 14. Producción de IAA. A) Placa revelada de prueba de producción de IAA. 12 cepas psicotolerantes por duplicado en dos diferentes condiciones de concentración de L- Trp.; C1: Medio PDB sin inocular sin triptófano; C2: Medio PDB sin inocular con 400 µg de L- Trp; C3: Medio PDB sin inocular con 1000 µg de L- Trp; B) Cuantificación de IAA producido por las 12 cepas, incubadas a 15 °C.

Prueba de producción de sideróforos.

La detección de la producción de sideróforos se llevó a cabo mediante la metodología CROME AZUROL de doble capa reportada por Hu y Ku, 2011. Ésta es una prueba colorimétrica de aparición de halos amarillos o naranja sobre placas de cromo azurol (CAS), que han sido inoculadas con organismos capaces de producir agentes quelantes del Fe.

La prueba se realizó con CAS agar como capa inferior y YPD agar como capa superior que permitió el crecimiento de los microorganismos sobre el medio selectivo, ya que CAS suele ser tóxico para las levaduras y bacterias.

La inoculación se hizo con 5 μ l de cultivos con DO_{600} nm de 0.2.

El agar CAS fue preparado de acuerdo a Schwyn y Neilands (1987). La mezcla resultante de color azul oscuro fue diluida 5 veces y esterilizada en autoclave. Posteriormente se agregó agar al 2% para solidificar.

La incubación se hizo a 4, 15 y 30 °C durante 7 días.

Se consideró como positivas, productoras de sideróforos a las cepas que formaron un halo amarillo- naranja alrededor de la colonia (Figura 15). Las cepas Ps1, Ps2, Ps3 y Ps4 mostraron claramente un resultado positivo para la producción de sideróforos a las tres temperaturas.

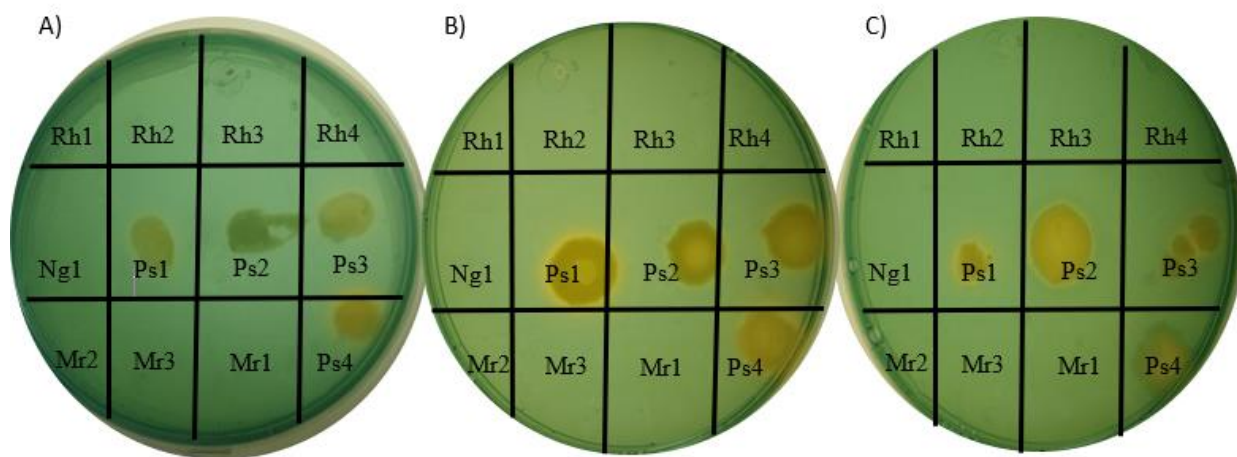


Figura 15. Actividad de sideróforos. Placas de doble capa CAS-YPD inoculadas con las 12 cepas, incubada a A) 4 °C; B) 15 °C; C) 30 °C, durante 7 días.

Prueba de actividad de CMCasas, Xilanasas y Quitinasas

La actividad de celulasas (CMCasas), xilanasas y quitinasas se determinó en placa, inoculando 5 μ l de cultivo ajustado a OD_{600nm} 0.2 de cada una de las cepas en medio mínimo Vogel's, sólido, suplementado con carboximetil celulosa, xilano de haya o quitina coloidal según fuera el caso al 1% como única fuente de carbono. La incubación se hizo a 4, 15 y 30 °C durante 7 días. Al día 7 de incubación, las placas se tiñeron con una solución de rojo Congo al 1% para aumentar la visibilidad de los halos de degradación de los polisacáridos. Figura 16, A, C, D

Las 8 cepas de levaduras dieron positivo en la prueba de actividad sobre CMC a 15 °C, la mayoría de ellas, excepto las cepas Mr2 y Mr3 mostraron actividad a 30 °C y solo la cepa Mr1 mostró actividad a 4 °C.; Ninguna bacteria tuvo la capacidad de crecer en ninguna de las fuentes de carbono, en ninguna de las temperaturas evaluadas.

Prueba de proteasas.

La actividad de proteasas se probó en placas de medio mínimo sólido adicionado con leche semidescremada al 2.5 %. La inoculación se hizo a partir de cultivos crecidos durante 48 horas a 15 °C en medio PDB. Se concentró el paquete celular y se hicieron lavados con agua destilada estéril, posteriormente, la densidad óptica fue ajustada a 0.2. Los halos de degradación de las proteínas de la leche se revelaron con rojo de Ponceau al 0.1%. Figura 16, B.

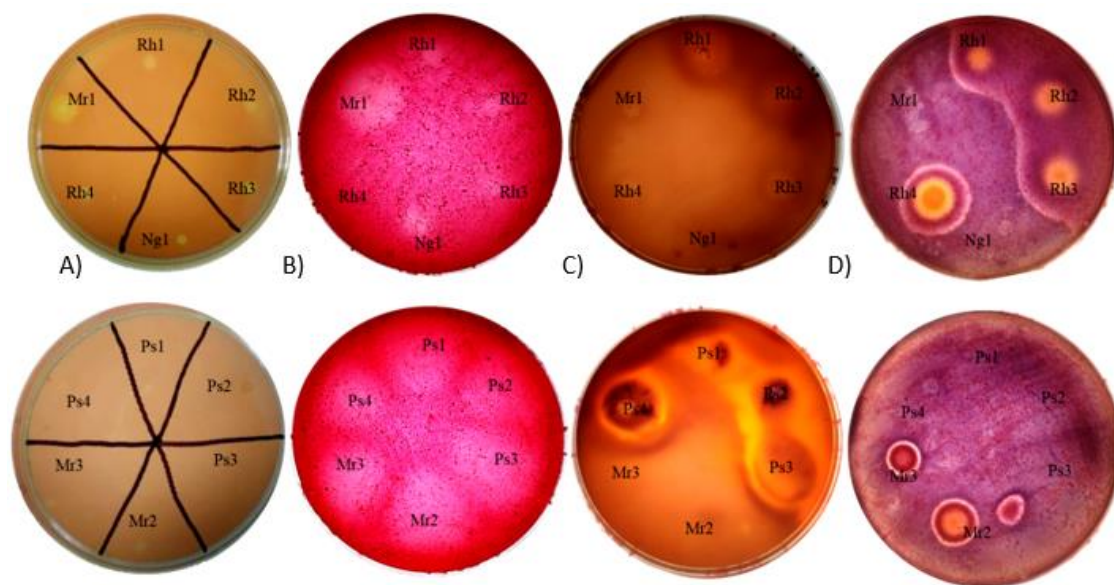


Figura 16. Pruebas bioquímicas cualitativas. Fotografías de resultados positivos observados en las pruebas donde las cepas en cuestión tuvieron la capacidad de crecer, usando como única fuente de carbono: A) CMC; C) xilano de haya; D) quitina coloidal; y mostraron la capacidad de degradar las proteínas de la leche, B) Prueba de actividad de proteasas, sobre leche descremada.

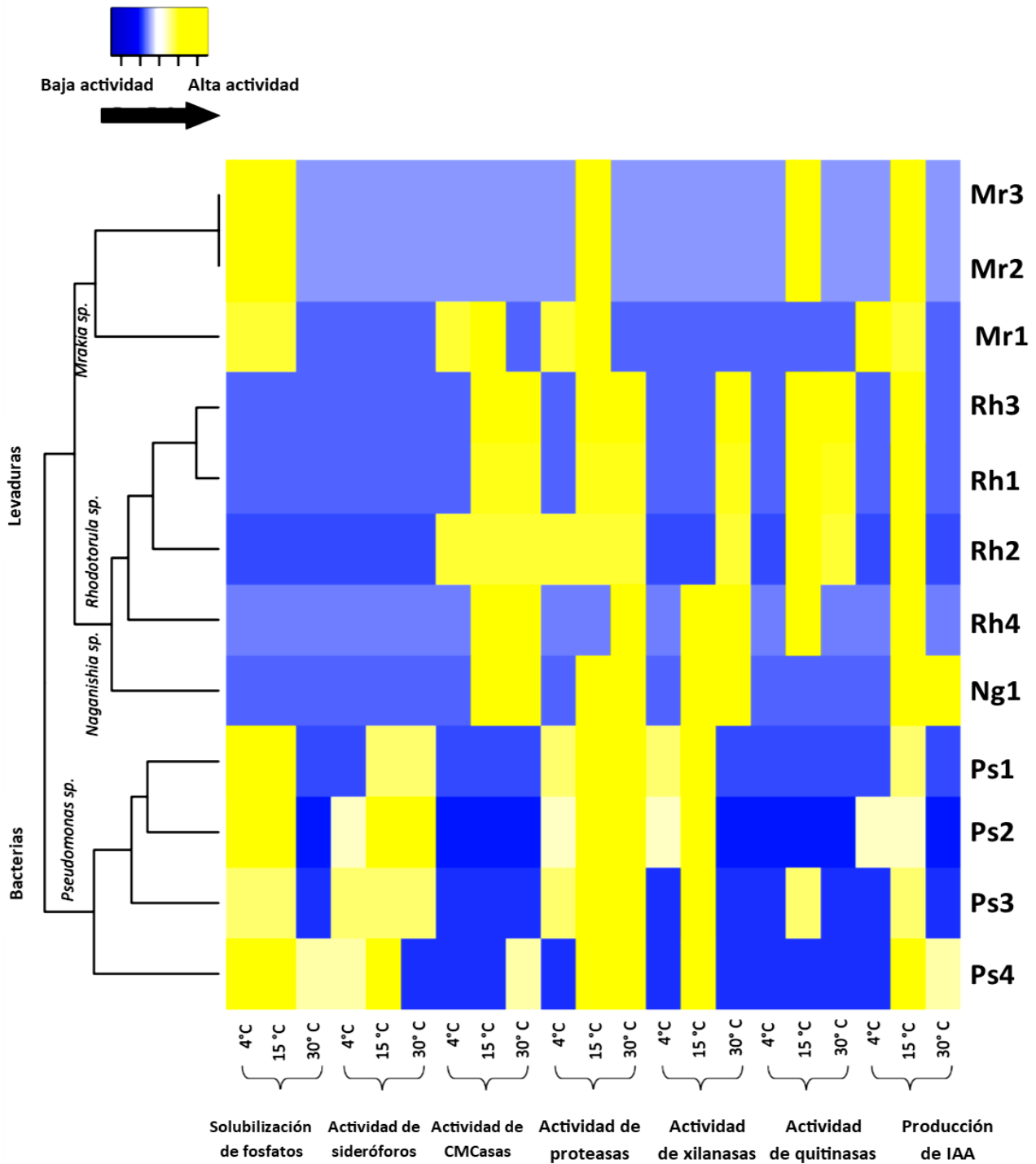


Figura 17. Mapa de calor de los resultados de la caracterización bioquímica de los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal. La escala de colores indica en color azul resultados negativos y en dirección hacia el tono amarillo se van mostrando de menor a mayor los resultados positivos.

7.5.2 Pruebas *in vitro* de germinación de semillas de jitomate.

Con el objetivo de conocer el efecto de cada una de las cepas aisladas (bacterias y levaduras), en la fase inicial del desarrollo de las plantas, se hicieron pruebas de germinación y crecimiento de plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), variedad saladette (El CIDF1, marca Harris Moran) en placas de Petri. La inoculación se hizo sobre dos modelos experimentales, uno utilizando cajas cuadradas de 100 X 100 X 15 mm. y otro en cajas de Petri circulares de 80 X 15 mm de diámetro.

Las semillas fueron esterilizadas con lavados de etanol al 70% durante 5 minutos, con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 2 minutos y con agua destilada estéril tres veces durante 2 minutos cada lavado.

Modelo de inoculación 1.

En el extremo superior de cajas cuadradas, se colocaron seis semillas de jitomate. En el extremo opuesto de las semillas se inoculó de manera independiente a cada una de las 12 cepas aisladas, provenientes de cultivos líquidos ajustados a $DO_{600\text{ nm}} 0.2$. por estriado con asa bacteriológica. La incubación de los tratamientos se hizo a 15 °C en una cava de vinos marca Hisense, con fotoperiodo de luz natural en el mes de septiembre del 2016 y a 22 °C en un cuarto de crecimiento de plantas, con fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad. Figura 18.

En este experimento, se detectaron algunas cepas capaces de promover la germinación antes que las semillas control en ambas condiciones de temperatura. Así mismo, se observaron diferencias en el desarrollo de raíces primarias y secundarias, así como en el alargamiento de tallos (datos no mostrados).

Sin embargo, las condiciones experimentales no fueron las más adecuadas ya que las condiciones de luz entre las dos variables no eran equiparables, además que para lograr un buen número de observaciones que permitieran hacer un análisis estadístico más preciso se necesitaba hacer un gran número de repeticiones del experimento. Por ello, se probó un nuevo modelo experimental bajo el mismo objetivo, ver el efecto de la inoculación de semillas de jitomate con las cepas psicrófilas/ psicrotolerantes sobre el tiempo de germinación y la promoción del crecimiento en etapas iniciales del desarrollo de las plantas. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Padilla en Colegio de Posgraduados en la ciudad de Texcoco.

Modelo de inoculación 2.

El modelo de inoculación 2, consistió en colocar un inóculo con cada una de las cepas independientes de manera circular a partir de un cultivo de $D.O_{600\text{ nm}}$ de 0.2 sobre medio MS sólido en placas circulares de 80 mm de diámetro. Después de seis días de crecimiento, se colocaron en el centro del inóculo circular aproximadamente 24 semillas de jitomate previamente lavadas y desinfectadas. Figura 19.

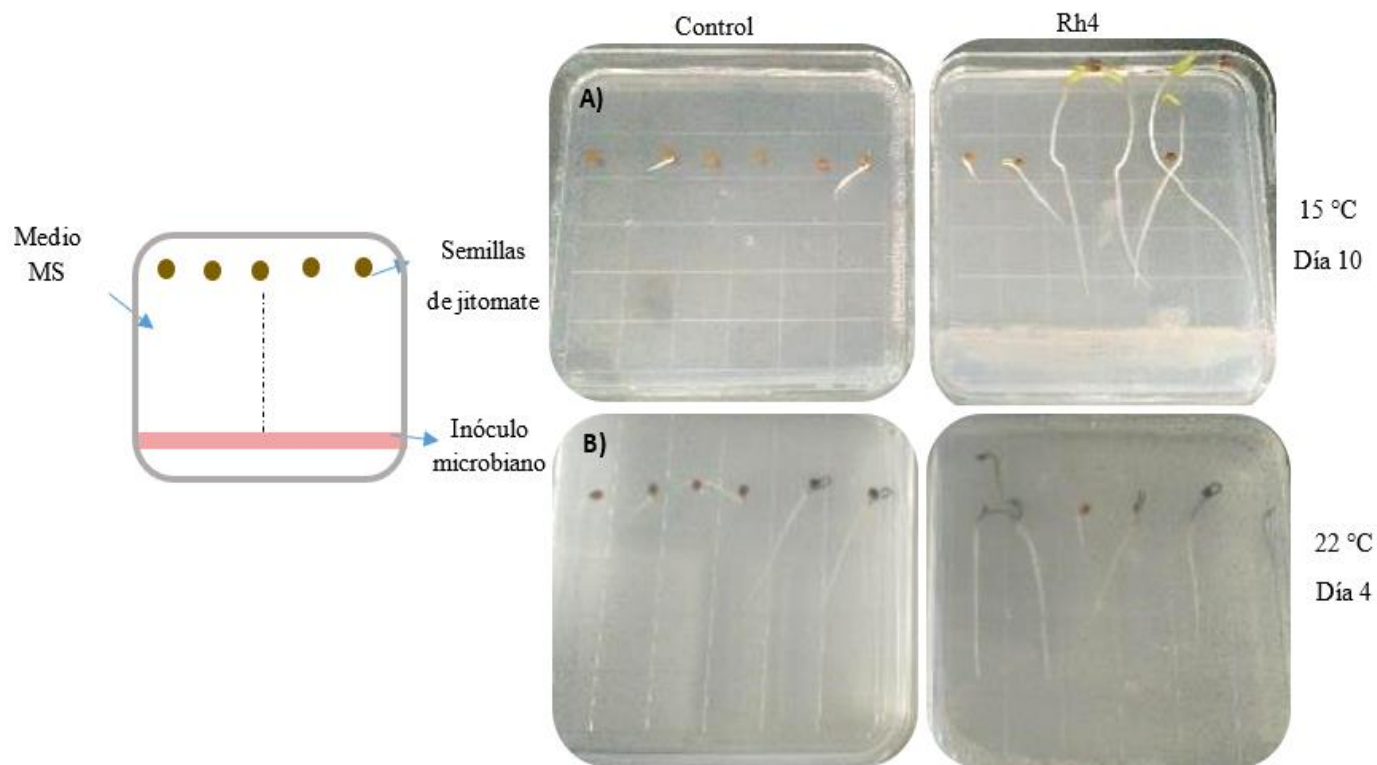


Figura 18. Modelo de inoculación 1. Prueba de germinación de semillas de jitomate a 15 y 22 ° C: A) control negativo (semillas sin inocular) y semillas inoculadas con la cepa Rh4 a los 10 días posteriores a la siembra a 15 ° C; B): control negativo (semillas sin inocular) y semillas inoculadas con la cepa Rh4 a los 4 días posteriores a la siembra a 22 ° C.

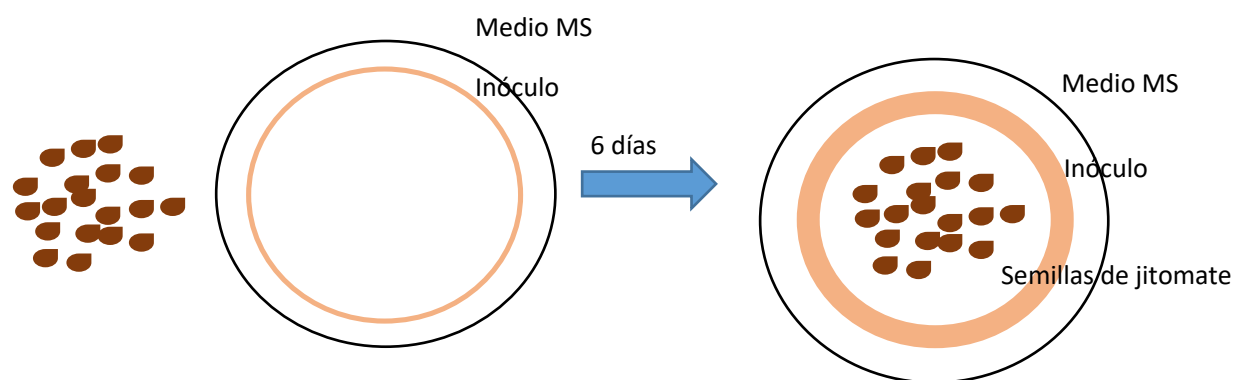


Figura 19. Modelo de inoculación 2. Prueba de germinación de semillas de jitomate inoculadas con los aislados del volcán Xinantécatl.

Las placas con inóculo y semillas se colocaron en una cámara de crecimiento de plantas a 15 y 22 ± 1 ° C con fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad. A partir del tercer día se tomaron datos de número semillas germinadas por día en cada uno de los tratamientos en ambas temperaturas.

El porcentaje de germinación en relación al tiempo (días) parece ser uno de los efectos más claros que presentó el experimento, donde algunos de los tratamientos realizados con las cepas parecen promover o acelerar la germinación en comparación con el tratamiento testigo (sin inocular).

Sobre este modelo, se hicieron varios eventos experimentales para evaluar la germinación de semillas de jitomate. Se probaron semillas de jitomate variedad Saladette (marca Hortaflores), variedad cereza (Sacadas de frutos, marca Cherubs) y variedad Saladette con semillas certificadas, que garantizan el 99% de viabilidad, marca Harris Moran.

El efecto de la disminución de tiempo de germinación se mostró en todas las variedades probadas. Así mismo, se detectaron cambios en la morfología de las raíces de plántulas emergidas de los tratamientos con algunas de las cepas de bacterias y levaduras.

En los tratamientos con las cepas Mr1 y Mr3 que se incubaron a 22 °C, el brote de la radícula se detectó en el día dos, mientras que las semillas sin inoculación (control negativo) mostraron aparición de la radícula en el día 3. Las semillas de algunos tratamientos que se incubaron a 15 °C, mostraron la aparición de la radícula en el día 10, mientras que las semillas control germinaron en el día 12.

En la figura 20, se muestran algunos ejemplos de la prueba de germinación realizada a 22 °C. Las imágenes fueron tomadas por el Dr. Daniel Padilla Chacón, en el Colegio de Posgraduados, Texcoco, México.

Los datos de porcentaje de germinación fueron evaluados por un análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre tratamientos. Gráfica 1.

La tasa de germinación o GRI, obtenida de esta estrategia experimental, muestra que la germinación ocurre antes en semillas que se inocularon con las cepas Rh2, Ng1, RH4, Mr1 y Ps3 a 15 °C y con las cepas Rh1, Rh2, Rh3, Ng1, Rh4, Mr1, Mr2, Mr3, Ps1, Ps2 y Ps3, obteniendo mejores resultados con las cepas Rh4, Ng1, Mr1, Mr3 a 22 °C.

La tasa del índice de germinación, GRI por sus siglas en inglés, se determinó a partir de la fórmula reportada por Kader en 2005.

$GRI = G1 / 1 + G2 / 2 + \dots + Gx / x$, donde G1 = porcentaje de germinación \times 100 sobre el primer día después de la siembra, G2 = porcentaje de germinación \times 100 sobre el segundo día después de la siembra. El GRI se da en % / día.

Al igual que en el modelo de inoculación 1, se observaron diferencias en el desarrollo temprano de las plántulas, la inoculación con algunas cepas de levaduras mostró promoción del alargamiento de la raíz principal, mientras que las cepas bacterianas, parecen acortarla y favorecer el desarrollo de raíces laterales.

Las levaduras correspondientes a las cepas Rh1, Rh2 y Rh4, así como Ng1, mostraron un considerable aumento en la longitud del hipocótilo, en ambas temperaturas probadas. En las figuras 21 y 22, se muestran fotografías tomadas por el Dr. Padilla, con ayuda de un equipo

de fenotipificación marca LemnaTech. Las fotos corresponden a plántulas germinadas a partir del experimento antes descrito, en el modelo de inoculación 2, con semillas de jitomate variedad cereza y Saladdette respectivamente, con temperatura de inoculación a 22 °C.

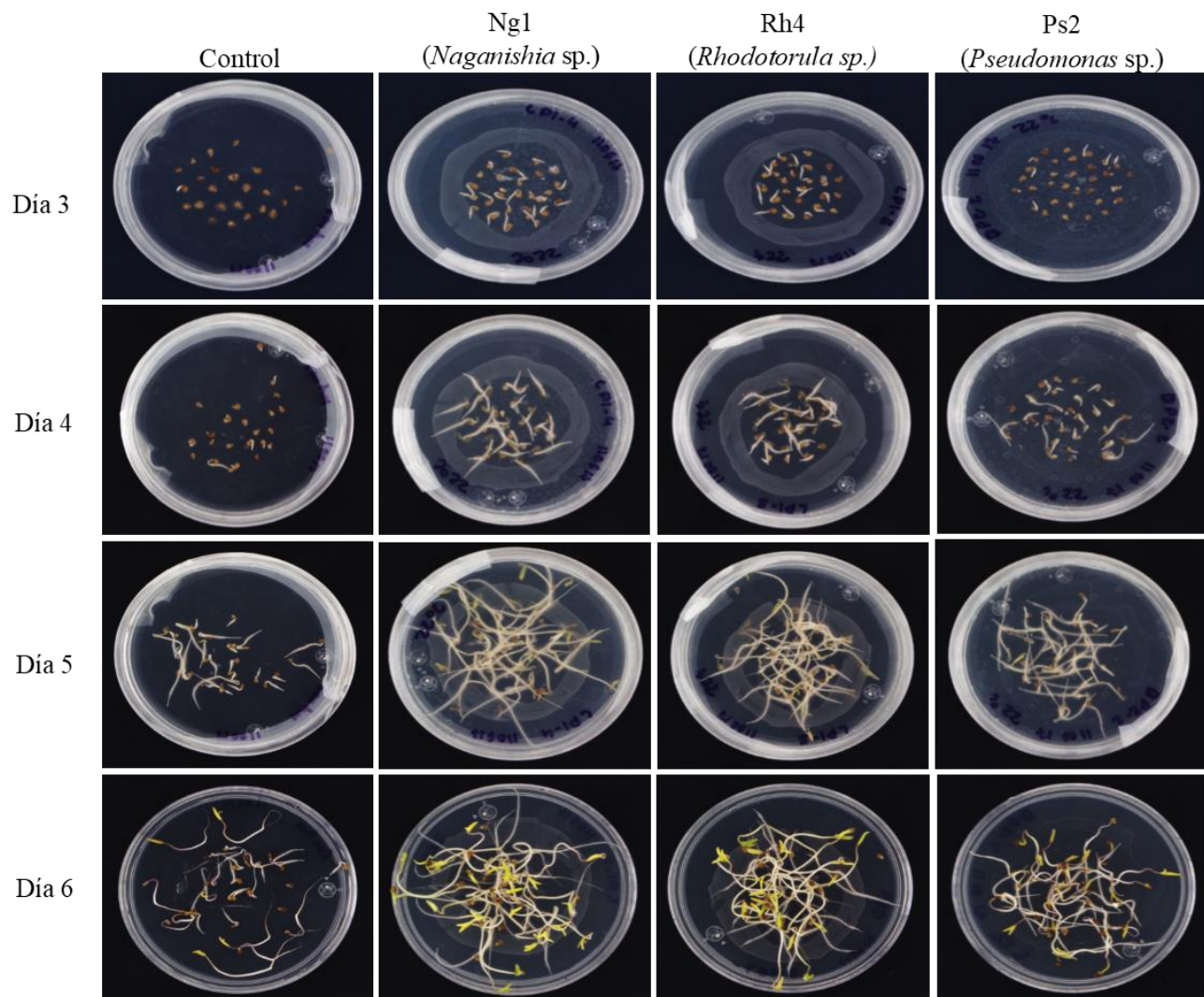


Figura 20. Prueba de germinación sobre el modelo de inoculación 2. Fotografías tomadas a diferentes días, posteriores a la siembra de semillas sobre cajas inoculadas con las levaduras Ng1 y Rh4, así como de la cepa bacteriana Ps2. Las semillas control, corresponden a semillas desinfectadas, no inoculadas. Imágenes tomadas por el Dr. Padilla Chacón, adscrito al Colegio de Posgraduados.

Gráfica 1. Porcentaje de germinación de semillas de *S. lycopersicum*, variedad Saladdette, (EL CID F1, Harris-Morán), inoculadas con las 12 cepas aisladas del volcán Xinantécatl y semillas sin inocular como tratamiento control. A) Prueba de germinación llevada a cabo a 22 ± 1 °C; B) Prueba de germinación llevada a cabo a 15 °C. Se muestran las barras del promedio y de desviación estándar. Las letras diferentes, atienden a diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía y comparación múltiple de medias de Tukey, cuando $p \leq 0.5$.

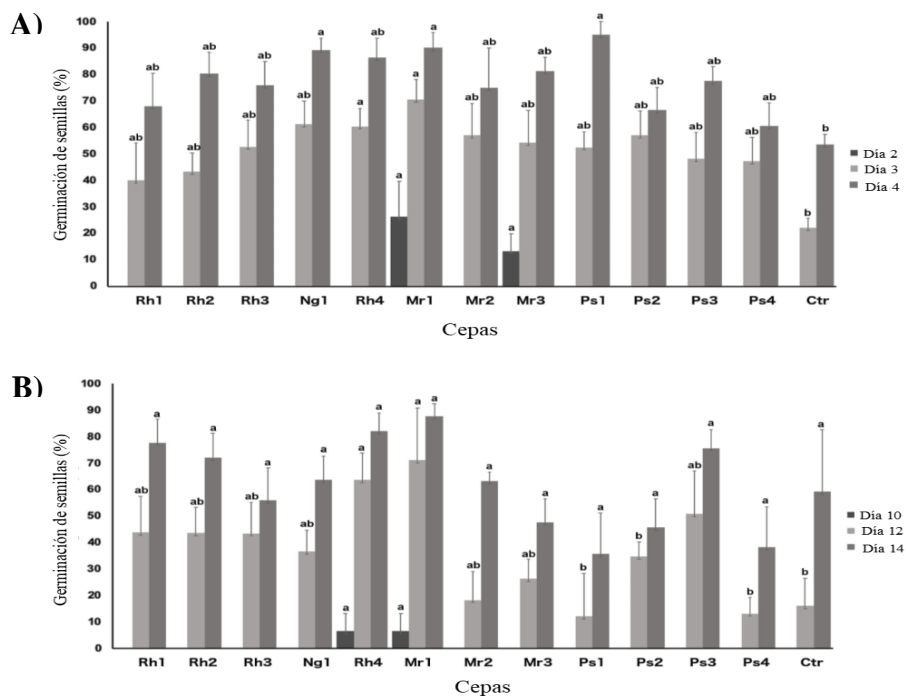


Figura 21. Fotografías de plántulas provenientes de la prueba de germinación, con las cepas Rh2 y Ng1. Del lado derecho, se muestran las semillas germinando al día 4 y las plántulas corresponden al día 6 a partir del inicio del experimento. La longitud del hipocotilo en las plantas provenientes de semillas inoculadas, mostraron ser diferentes (mayores) a las no tratadas.

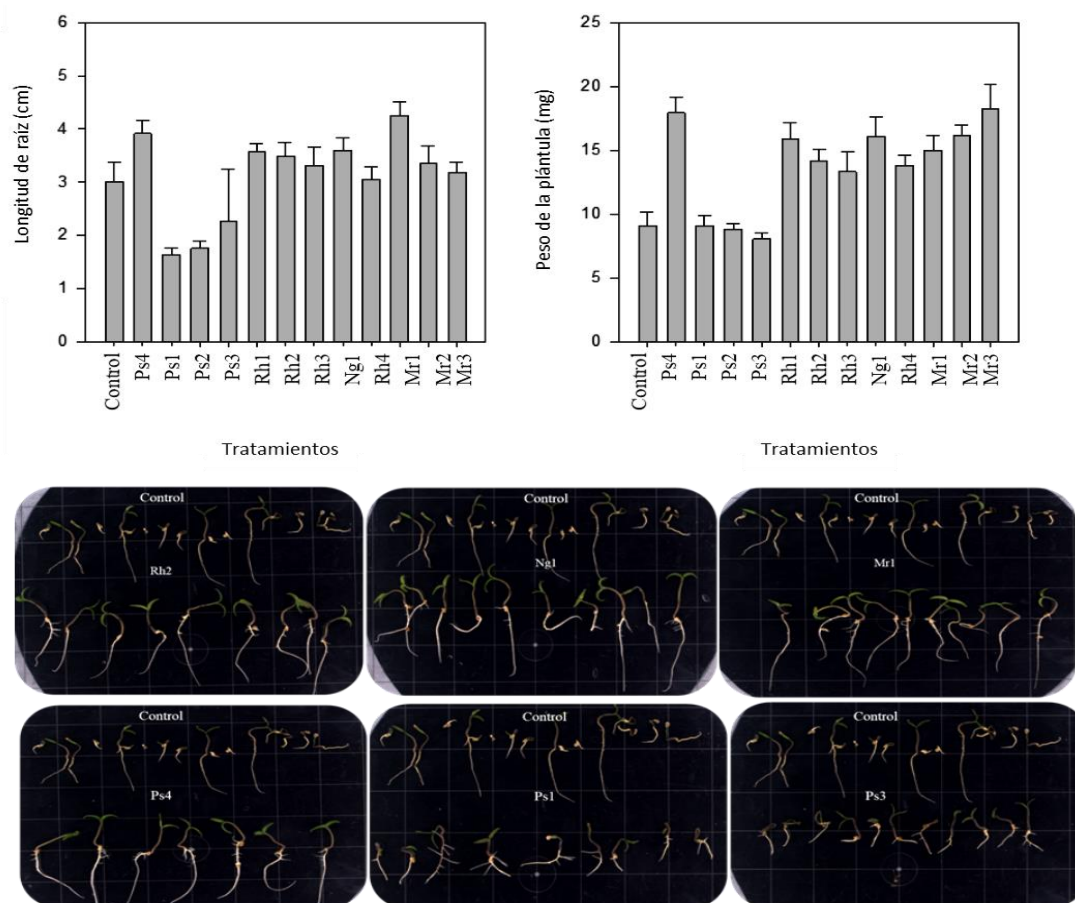


Figura 22. Datos experimentales y fotografías de plántulas provenientes de una prueba de germinación, con el modelo de inoculación 2, incubado a 22 °C. Las gráficas muestran los promedios y desviación estándar de la longitud de la raíz principal y el peso fresco total de las plántulas, n=10.

7.5.3 Promoción del crecimiento de plántulas de jitomate, prueba *in vitro*.

Teniendo como antecedentes, las observaciones sobre el desarrollo de las plántulas de la prueba de germinación, se planteó evaluar la promoción del crecimiento de plántulas de jitomate mediadas por microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes.

Los experimentos se llevaron a cabo en frascos de micropropagación de vidrio transparente, que contenían medio Murashige y Skoog (MS) sólido pH 5.8, al 0.8% de agar. Las semillas de jitomate utilizadas para este y los experimentos posteriores, correspondieron a la variedad saladdette. El CID F1 (Harris Moran), mismas que se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 70% y se germinaron en placas de Petri sobre agar agua al 0.8%. Las plántulas de semillas que germinaron el mismo día y con características fenotípicas similares se transfirieron a los frascos. Se colocaron tres plántulas por unidad experimental y se hicieron por triplicado (figuras 23, 24 y 25), sin embargo, en dos eventos experimentales

posteriores, que nos permitieron confirmar las observaciones, solo se colocó una planta por unidad experimental (frasco), con seis réplicas, por tratamiento (figura 26).

Las plántulas se aclimataron durante una semana, en un cuarto de cultivo a 22 °C con intensidad luminosa de 1900 lux y fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad. Posteriormente, los frascos que contenían las plántulas se inocularon con 12 gotas de 10 microlitros de cultivo en medio PDA (levaduras) o LB (bacterias) con una densidad óptica de 0.2, de cada cepa independiente, en la periferia de la superficie del medio de cultivo y se incubaron en dos condiciones de temperatura diferentes 22 °C y 15 °C, con fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad., durante 30 días. Como control negativo, se consideraron las plántulas que se inocularon con medio de cultivo PDA o LB estéril. Las mediciones de la longitud total, la raíz principal y el tallo, así como el peso seco total, de la raíz y parte aérea, se tomaron en el punto final (30 días después de la inoculación) de cada tratamiento. A cada parámetro evaluado, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con comparación múltiples de medias de Dunnett, utilizando el software GraphPad Prism 6.

Las 12 cepas aisladas del volcán Xinantécatl se utilizaron para evaluar la promoción del crecimiento de las plántulas de jitomate bajo este modelo experimental, sin embargo, la inoculación con las bacterias (Ps1, Ps2, Ps3 y Ps4) disminuyó el crecimiento de las plántulas en comparación con las plántulas control (datos no mostrados), pero el tratamiento de inoculación con levaduras mostró un aumento en la longitud del tallo (cuando las plántulas se inocularon con las cepas Rh1, Ng1) y del peso seco (cuando la interacción ocurrió con la cepa Mr1), en plántulas que fueron incubadas a 15 °C. Así mismo, se observó un desarrollo más vigoroso en plantas tratadas con las levaduras antes citadas, respecto a las plantas no inoculadas que mostraron tallos y hojas enrollados con aspecto deprimido.

Se observaron resultados similares cuando la temperatura de incubación fue de 22 °C. En este caso, se detectaron mejores resultados en el aumento de la longitud del tallo cuando la inoculación se hizo con las cepas Rh1 y Rh2, el peso seco del tallo con la cepa Ng1 y desarrollo abundante del sistema radicular representado en peso seco, con las cepas Rh2, Rh3 y Ng1.

Cuando las plantas fueron colocadas de manera individual en los frascos e inoculadas con las cepas, resaltaron cuatro tratamientos, los realizados con las cepas Rh2, Ng1, Mr1 y Mr2, coincidiendo con las observaciones previas de la misma prueba realizada con tres plántulas por frasco.

Cuando las plantas estuvieron incubadas a 22 °C, se detectaron diferencias significativas en la longitud del tallo, en aquellas que estaban inoculadas con la cepa Ng1, sin embargo, las diferencias en general no fueron tan evidentes como en las plantas que estaban incubadas a 15 °C. Las plantas que se desarrollaron en condiciones de baja temperatura, y que estaban inoculadas con las cepas Rh2, Ng1, Mr1 y Mr2, mostraron diferencias significativas respecto a las plantas no inoculadas (control) en la longitud del tallo. En las mismas condiciones de

crecimiento, las plantas inoculadas con la cepa Mr2, tuvieron la raíz principal más larga respecto al resto de los tratamientos y las plántulas inoculadas con la cepa Mr1, registraron mayor peso seco total, en comparación con los demás tratamientos.

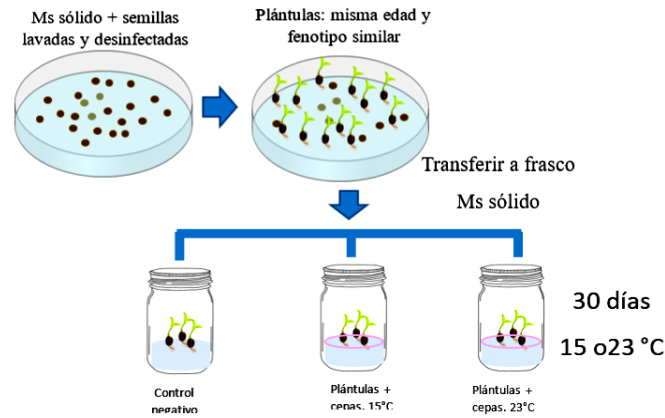


Figura 23. Diagrama experimental de la prueba de promoción del crecimiento de plántulas, en frascos.

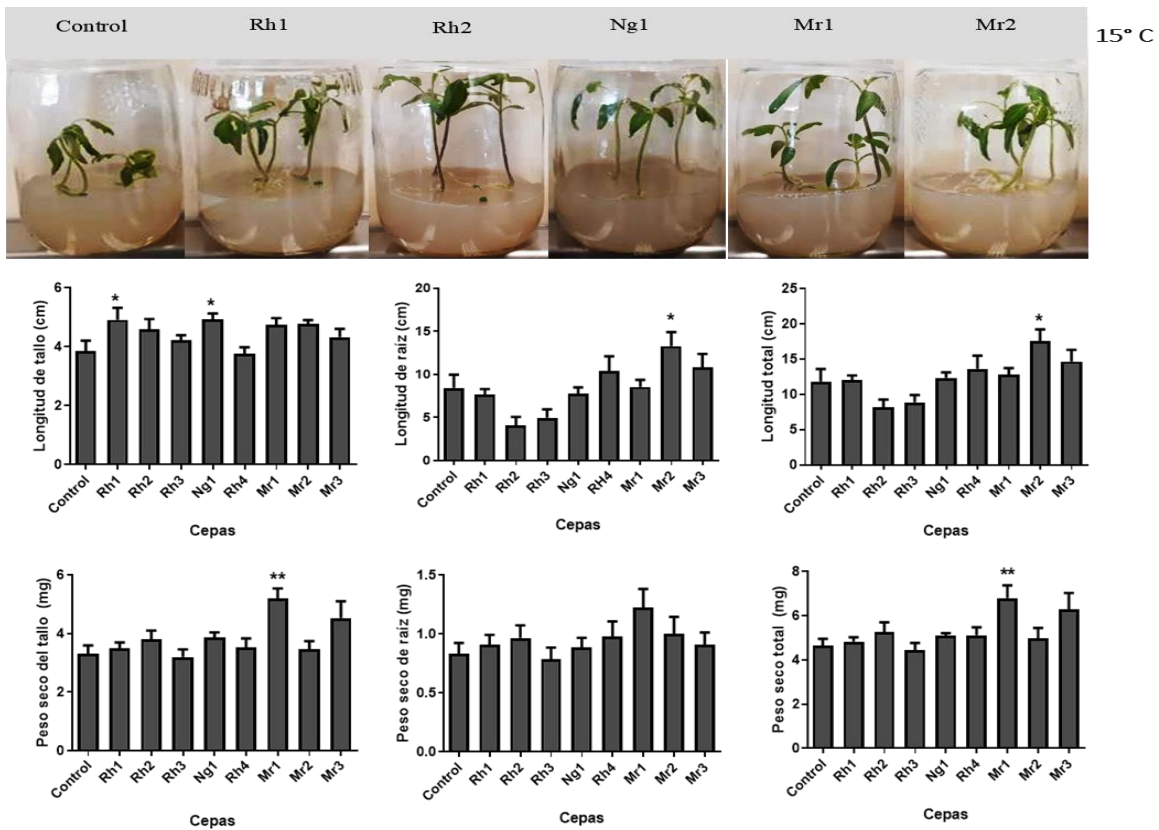


Figura 24. Experimento de promoción del crecimiento en frascos. Superior: plantas de 30 días, creciendo en frascos de micropropagación, en medio MS, inoculados con levaduras aisladas del volcán Xinantécatl y plantas sin inocular como tratamiento control; Inferior: Gráficas de análisis estadísticos realizados, ANOVA de una vía, seguido de comparación múltiple de medias por el método de Dunnett, cuando $p \leq 0.05$. Los asteriscos representan $*p < 0.05$; $** p < 0.01$.

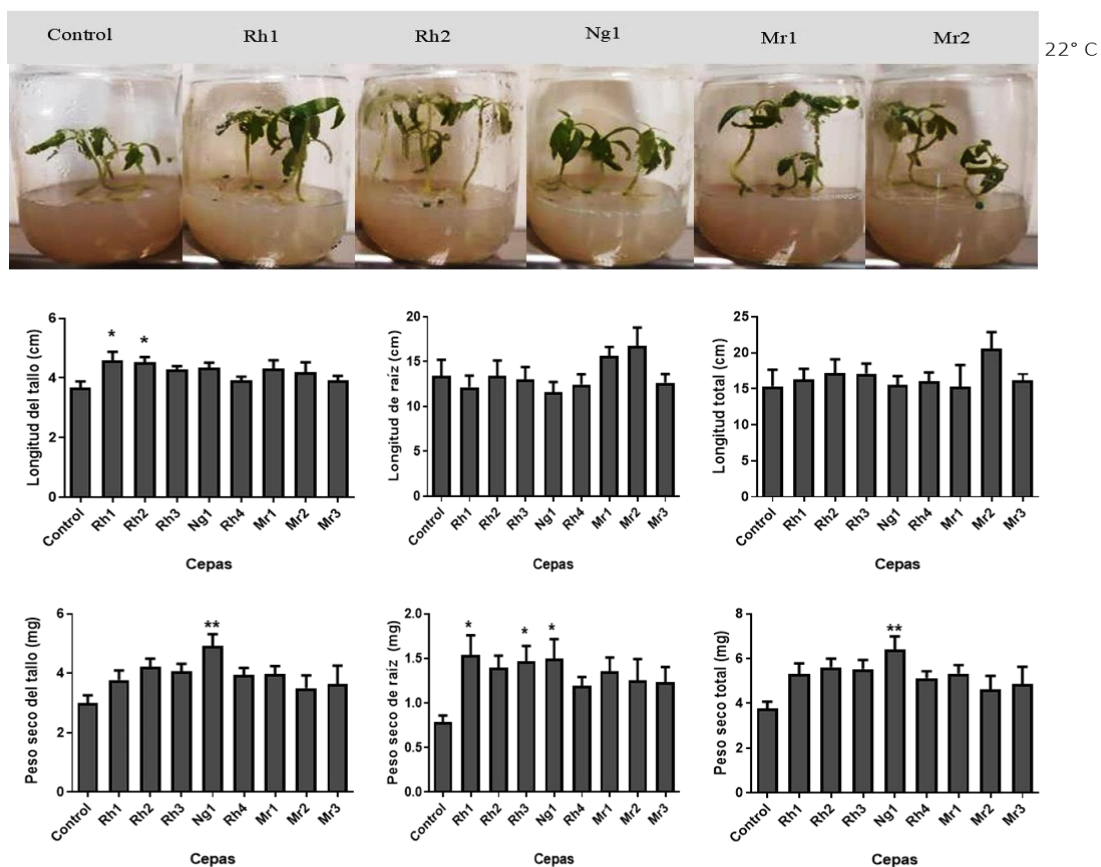
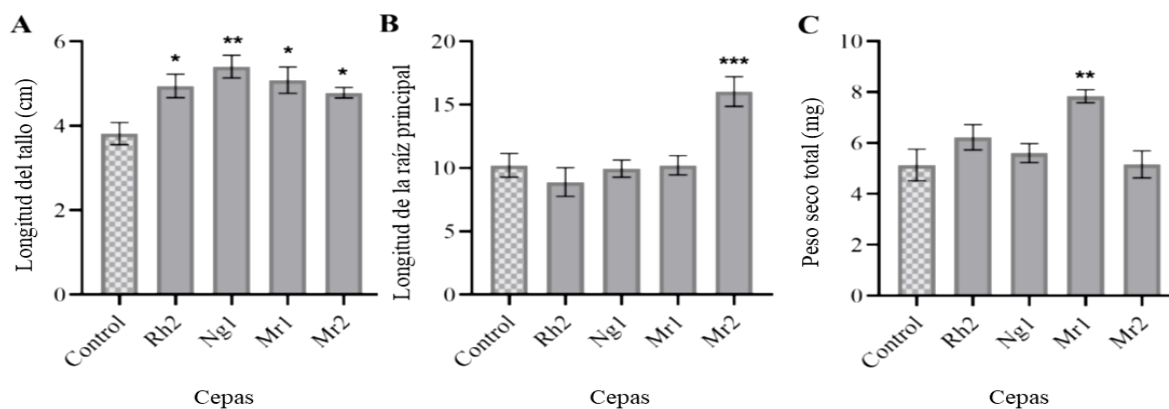


Figura 25. Experimento de promoción del crecimiento en frascos. Superior: plantas de 30 días, creciendo en frascos de micropropagación, en medio MS, inoculados con levaduras aisladas del volcán Xinantécatl y plantas sin inocular como tratamiento control; Inferior: Gráficas de análisis estadísticos realizados, ANOVA de una vía, seguido de comparación múltiple de medias por el método de Dunnett, cuando $p \leq 0.05$. Los asteriscos representan * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



Figura 26. Prueba de promoción del crecimiento de plántulas en frasco, inoculadas con las cepas Ng1 y Rh2. El control corresponde a plántulas no inoculadas. En este evento experimental, se colocó solo un individuo por unidad experimental. La fotografía corresponde a los tratamientos que se incubaron a 15 °C.

Gráfica 2. Análisis estadístico de la longitud del tallo, longitud de raíz principal y peso seco total, de plántulas incubadas con las cepas Rh2, Ng1, Mr1 y Mr2, cuando estas crecieron en frascos que contenían MS, a 15 °C. ANOVA de una vía, seguido de comparación múltiple de medias por el método de Dunnett, cuando $p \leq 0.05$. Los asteriscos representan * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



7.5.4 Promoción del crecimiento vegetal, condiciones de invernadero.

La fase fenológica vegetativa y reproductiva de las plantas de jitomate, son esenciales para definir el rendimiento final que se obtendrá de ellas, ya que la estimulación o los posibles daños que se presenten en ellas, tendrán consecuencias posteriores en la producción y maduración de los frutos. Es por ello que se plantearon experimentos de inoculación y establecimiento de la interacción de las cepas aisladas del volcán Xinantécatl, con plantas de jitomate que se mantuvieron en condiciones de invernadero desde la fase vegetativa temprana, hasta el inicio de la reproductiva.

Lotes de 18 plantas por tratamiento, fueron inoculadas con las cepas de levaduras que mostraron resultados más promisorios para la promoción del crecimiento vegetal, éstas fueron Rh1, Rh2, Ng1, Mr1 y Mr2, un lote más fue reservado de inoculación para considerarlo como tratamiento testigo. Todas las plantas analizadas provenían de semillas EL CID F1 (Harris Moran) previamente germinadas. Las plántulas se seleccionaron, aquellas con características fisiológicas similares se transfirieron a caja magenta, con medio MS, para homogenizar la población.

Las plantas de dos semanas de edad fueron transferidas a sustrato Peat Moss (esterilizado en autoclave) contenido en macetas. Se colocaron en un invernadero (perteneciente al Instituto de Biotecnología de la UNAM), expuestos a luz natural, en los meses de mayo – agosto, con temperatura de 26 ± 2 °C y riego con agua corriente cada tercer día.

Cuando las plantas cumplieron tres semanas en el invernadero, fueron inoculadas con 1.5×10^7 unidades formadoras de colonia (UFC) de cada una de las cepas seleccionadas, contenidos en 4 ml de medio de cultivo PDB. La inoculación se hizo a nivel de sustrato, cuando éste había sido previamente regado y se encontraba húmedo.

A las plantas testigo se les agregaron 4 ml de medio de cultivo PDB, sobre el sustrato.

El esquema de inoculación se repitió dos veces más, dos semanas después de la primera y la segunda inoculación consecutivamente.

Posterior a las inoculaciones, 8 plantas de cada tratamiento fueron separadas para evaluar la tolerancia a estrés por baja temperatura, determinada por porcentaje de supervivencia. Las plantas se incubaron en el cuarto frío del Centro de Investigación en Biotecnología, a temperatura de 2 ± 2 °C., por 96 horas, posterior a eso, regresaron al invernadero para su recuperación. Los eventos de estrés y recuperación se hicieron tres veces.

La prueba de estrés por frío, no mostró resultados significativos entre tratamientos cuando se evaluó el porcentaje de supervivencia, sin embargo, se observó que las plantas inoculadas con las cepas Rh2 y Ng1, mostraban aspecto muy similar a las plantas que crecían en condiciones óptimas en invernadero, ya que las hojas se veían turgentes y los tallos erguidos, por más tiempo que el resto de las plantas. Figura 27.

10 plantas de cada tratamiento fueron mantenidas en condiciones de invernadero hasta el inicio de la etapa reproductiva, para evaluar efectos de la promoción del crecimiento mediado por las levaduras inoculadas sobre la producción de biomasa total, radicular y aérea, altura de las plantas y longitud del sistema radicular, así como cantidad y tiempo de aparición de flores. Todas las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero hasta la aparición de los primeros brotes florales.

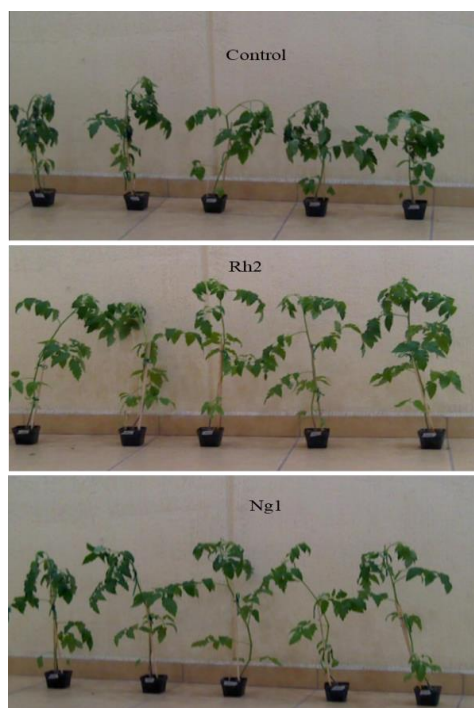


Figura 27. Prueba de estrés por frío. Fotografías comparativas de plantas que estuvieron expuestas a 96 horas de incubación a 2 ± 2 °C, tratadas previamente con tres ciclos de inoculación con las cepas Rh2 y Ng1, así como plantas libres de inoculación (control).

Las plantas se sacrificaron para poder tomar medidas de longitud y peso de la parte aérea y radicular, también se evaluaron el número de nodos foliares, escapos florales y cantidad de flores abiertas, y se registró la aparición de frutos. Los análisis estadísticos consistieron en ANOVA de una vía, con comparación múltiple de medias de Dunnett cuando $P \leq 0.05$, $n=10$. Figura 28.

Los resultados más relevantes y estadísticamente significativos se encontraron en el desarrollo de la parte aérea de las plantas inoculadas con dos de las cepas probadas, correspondientes a *Rhodotorula* y *Naganishia*.

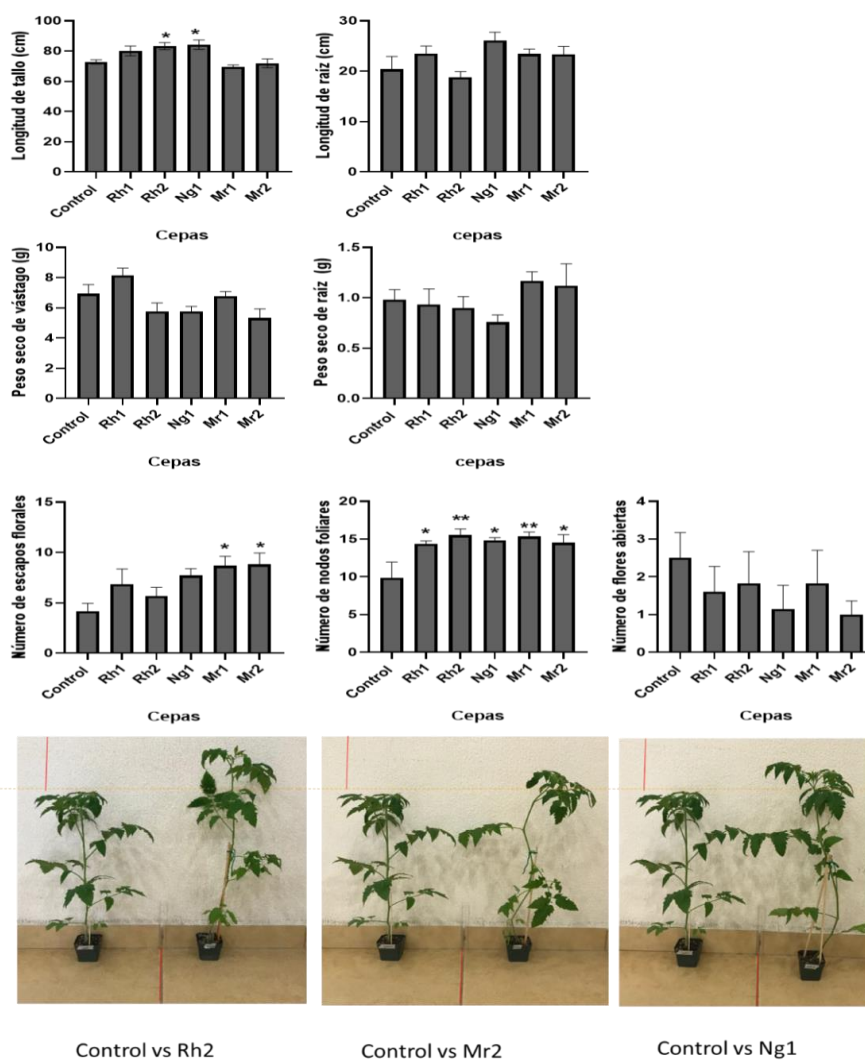


Figura 28. Crecimiento de plantas en condiciones de invernadero. Superior: Análisis estadístico de plantas que crecieron en condiciones de invernadero, desde el inicio de la fase vegetativa, hasta el inicio de la fase reproductiva, con esquema de tres inoculaciones con las cepas Rh2, Mr2 y Ng1 de manera independiente; Inferior: fotografía comparativa de plantas tratadas con levaduras contra plantas control, 1.5 meses posteriores a la transferencia a maceta, en condiciones de invernadero.

7.6 Pruebas de control biológico contra fitopatógenos.

Muchos de los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas se han relacionado con la inhibición o el retraso del crecimiento de organismos nocivos para las plantas, como parte de sus mecanismos indirectos.

En este sentido, se probó el efecto de cada una de las cepas como posibles agentes de biocontrol contra cuatro organismos fitopatógenos: *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*., *Alternaria solani*. y *Phytophthora capsici*

Los tratamientos realizados consistieron en poner a crecer a las cepas de manera independiente, confrontando a cada uno de los organismos fitopatógenos sobre medio Agar Dextrosa Papa sólido en cajas de Petri de 80 mm de diámetro. El diseño experimental consistió en poner un círculo de aproximadamente 5 mm de diámetro de micelio de cada fitopatógeno en el centro de la caja y en la periferia, se inocularon las cepas de bacterias y levaduras psicrófilas y psicrotolerantes provenientes de un cultivo líquido en medio Papa Dextrosa (PDB) con $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.2. Los tratamientos control fueron aquellos donde crecieron los fitopatógenos sin confrontación. Figura 29.

Al día 10, cuando los fitopatógenos control habían llenado la caja o bien algunas de las cepas habían sido sobrepasadas por los hongos, se tomaron medidas del halo de crecimiento de cada hongo confrontado con las 12 cepas y los hongos sin inocular (control). A partir del promedio del diámetro de los halos de crecimiento se calculó el porcentaje de inhibición tomando como 100 % el diámetro de crecimiento del hongo control y sustrayendo a partir de éste el porcentaje de crecimiento de los fitopatógenos confrontados.

Los fitopatógenos más afectados en su crecimiento por un número mayor de cepas fueron *Fusarium* sp y *A. solani*. Las cepas que causaron un mayor porcentaje de inhibición para un mayor número de fitopatógenos fueron: Ps1, Ps3, Rh1, Rh2, Ng1 y Rh4.

También se hizo un ensayo de respuesta y progresión de la infección de hojas de *S. lycopersicum*, provenientes de plantas que habían sido previamente inoculadas con las cepas de levaduras Rh1, Rh2, Mr1, Mr2 y Ng1, así como de plantas que no habían sido inoculadas con levaduras (tratamiento control). Se tomaron tres hojas de tres plantas diferentes, por cada tratamiento. Se colocaron sobre una cámara húmeda (caja de Petri cuadrada, con papel humedecido con 10 ml de agua destilada estéril), y sobre el centro del haz de la hoja, se colocó una porción de agar de 5 mm de diámetro conteniendo micelio de *Alretnaria solani*, proveniente del crecimiento del hongo en medio de cultivo PDA. Las hojas con el micelio, se incubaron a temperatura ambiente por cinco días. 24 horas después de la inoculación de las hojas con el fitopatógeno, la porción de agar fue retirada y se tomaron fotografías. Figura 30. La infección por el fitopatógeno fue más lenta y menos agresiva cuando las hojas provenían de plantas que habían sido inoculadas, sugiriendo que las levaduras podrían estar involucradas en el encendido del sistema de defensa de las plantas. Estos datos deberán confirmarse en estudios posteriores.

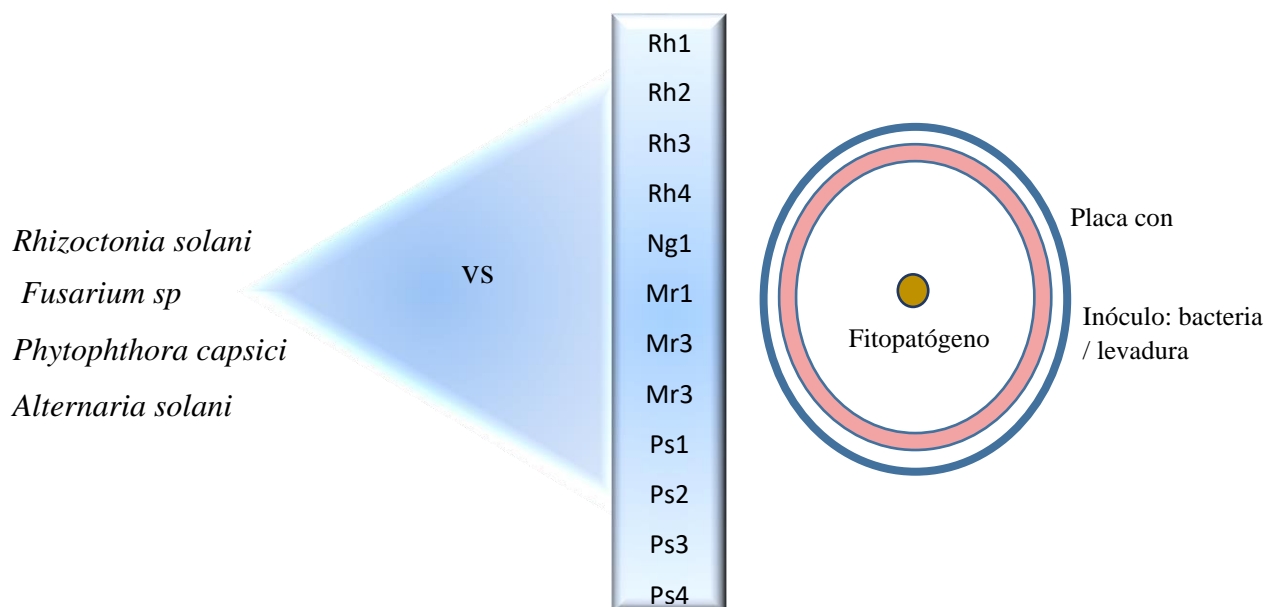


Tabla 6. Porcentaje de inhibici6n de fitopat6genos, por confrontaci6n con las cepas aisladas del volc6n Xinant6catl. Las letras en super6ndice, representan las diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una v6a, Comparaci6n m6ltiple de medias por prueba de Tukey $P < 0.05$).

N/D: Inhibici6n de crecimiento del fitopat6geno, no detectada; N/G: Crecimiento de la cepa aislada no detectada.

| Cepas | Inhibici6n de crecimiento (%) | | | |
|-------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Phytophthora capsici</i> | <i>Alteraria solani</i> |
| Rh1 | 39.6 ± 1.1 ^b | N/D | 18.2 ± 2.1 ^c | 36.3 ± 0.4 ^c |
| Rh2 | 42.5 ± 2.9 ^b | N/D | 26 ± 0.6 ^a | 42.3 ± 0.7 ^a |
| Rh3 | 41.2 ± 4.5 ^b | N/D | 24 ± 0.6 ^b | 40.2 ± 1.1 ^b |
| Rh4 | 38.8 ± 0.8 ^{b^c} | N/D | 15.6 ± 0.0 ^d | 19.2 ± 0.0 ^d |
| Ng1 | 40.0 ± 1.4 ^b | N/D | 17.5 ± 1.6 ^c | 40.6 ± 0.4 ^b |
| Mr1 | 10.0 ± 1.9 ^f | N/G | N/G | 40.6 ± 0.4 ^b |
| Mr2 | 26.3 ± 2.2 ^d | N/D | N/D | 9.8 ± 1.8 ^e |
| Mr3 | 25.8 ± 1.8 ^d | N/D | N/D | 9.4 ± 4.0 ^e |
| Ps1 | 49.6 ± 1.1 ^a | 29.0 ± 0.6 ^a | N/D | 13.2 ± 0.4 ^d |
| Ps2 | 18.3 ± 4 ^e | 28.2 ± 1.0 ^a | N/D | 3.8 ± 0.7 ^f |
| Ps3 | 37.1 ± 1.8 ^c | 28.6 ± 0.6 ^a | 14.3 ± 2.1 ^{cd} | 13.7 ± 0.4 ^d |
| Ps4 | 24.2 ± 1.8 ^d | N/D | N/D | 1.7 ± 0.4 ^g |

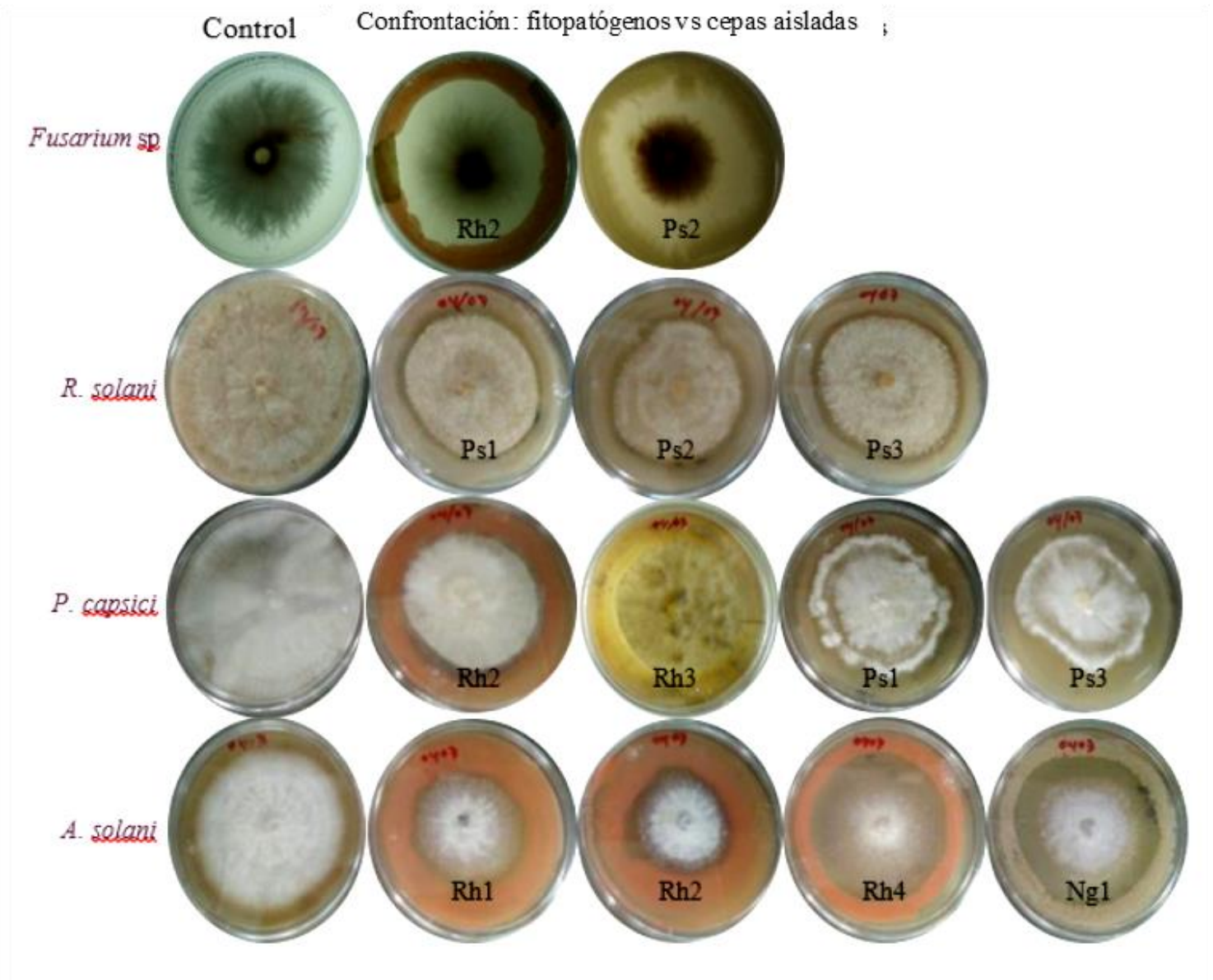


Figura 29. Prueba de control biológico. Fotografías representativas, tomadas al día 10 de la prueba de inhibición del crecimiento de fitopatógenos co- inoculados con las cepas que mostraron mejores porcentajes de inhibición.



Figura 30. Fitoprotección en hojas. Fotografía comparativa de la progresión de la infección mediada por *Alternaria solani*, sobre hojas de plantas de jitomate que crecieron en condiciones de invernadero, y fueron inoculadas en tres ocasiones con 1.5×10^7 UFC de las cepas Rh1, Rh2, Mr1, Mr2 y Ng1. Como control se muestran hojas de plantas que fueron inoculadas con el hongo fitopatógeno, pero no fueron inoculadas con las levaduras.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal han sido ampliamente estudiados en bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas y se han tomado como modelo para tratar de elucidar los mecanismos que manifiestan otros organismos, como las levaduras y hongos filamentosos. Esto ha facilitado la búsqueda de organismos no bacterianos, con potenciales aplicaciones en el sector agrícola.

Del año 2015 a la fecha, hubo un aumento importante en los reportes de nuevos organismos con la capacidad de promover el crecimiento vegetal e involucrar respuestas de modulación de hormonas relacionadas a estrés. Sin embargo, la información que se conoce sobre los mecanismos que pueden tener estos u otros microorganismos para amortiguar los daños causados por los efectos de estrés abiótico y que puedan estar asociados a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal aún es insuficiente.

Existe un reciente y creciente interés por evaluar y caracterizar organismos que provengan de lugares poco convencionales, tales como los ambientes extremos, que tengan la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Balcazar, 2015).

El volcán Xinantécatl, presenta actualmente características esenciales para el desarrollo de plantas y organismos asociados a ellas, con la capacidad de tolerar condiciones adversas para las formas de vida más comúnmente conocidas, ya que esta elevación volcánica es considerada un entorno extremo, debido a la gran altitud (4680 m), los bajos niveles de oxígeno (alrededor del 11%) y la presión atmosférica (alrededor de 1017 hPa), así como a las condiciones oligotróficas del suelo y las temperaturas considerablemente bajas (Luna *et al.*, 2009). Dadas estas características, hay una gran probabilidad de encontrar microorganismos adaptados al frío, capaces de mostrar algunos rasgos particulares como la promoción del crecimiento de las plantas, la protección a baja temperatura y la inhibición del ataque de los fitopatógenos, entre muchos otros

El muestreo en la zona del cráter del volcán, permitió el aislamiento de microorganismos con características psicrófilas y psicrotolerantes provenientes de suelo rizosférico de plantas que crecían en el volcán Xinantécatl. Las levaduras aisladas pertenecen a los géneros *Rhodotorula*, *Naganishia* (aisladas de la planta *Arenaria* sp.) y *Mrakia* (aislada de la planta *Draba* sp.), mientras que las bacterias corresponden al género *Pseudomonas*, (aisladas de la planta del género *Sisyrinchium*.) Todas las cepas mostraron al menos un rasgo promotor del crecimiento vegetal. Algunas de ellas aceleraron la germinación y favorecieron el alargamiento de tallos, raíces y estimularon la producción de biomasa seca en plantas de jitomate. La mayoría de las cepas también manifestaron actividad antifúngica.

Pseudomonas es un género bacteriano, con una amplia distribución en entornos extremos, incluidos los glaciares (Sherpa *et al.*, 2019), los desiertos (Omer, 2016) y los mares profundos (Sun *et al.*, 2018). De los cuatro aislados del nevado de Toluca, pertenecientes al género *pseudomonas*, es evidente que la cepa Ps4 no está tan estrechamente relacionada con sus otras contrapartes bacterianas, ya a pesar de estar relacionada filogenéticamente con el género, ésta muestra diferente morfología de las colonias, así como cualidades bioquímicas e interacciones

con plantas y hongos no consistentes con las otras cepas. Esto puede deberse al hecho de que este aislado vino de una muestra de nieve, en lugar de una muestra de suelo.

También se encontraron aislamientos de levadura que pertenecen a géneros previamente documentados, aunque no se agruparon estrechamente con las secuencias de referencia en la reconstrucción filogenética. Dentro del clado de *Rhodotorula*, su pariente genético más cercano (*R. mucilaginosa*) está posicionado en otra rama del árbol filogenético, sugiriendo que no pertenecen a esta especie. Se encontraron resultados similares para las cepas relacionadas con *Mrakia* y *Naganishia*.

Las especies de *Rhodotorula* han sido aisladas de una amplia gama de ecosistemas cálidos y fríos (Alcaíno et al., 2015). Sin embargo, *Mrakia* y *Naganishia* son levaduras poco estudiadas hasta ahora, y se han descrito pocas especies (Tsuji et al., 2016). Las especies de *Naganishia*, en particular, han sido aisladas de los volcanes de la región de Atacama, incluidos los ambientes congelados (Schmidt et al., 2017). *Mrakia* también ha sido descrita como miembro dominante de las comunidades endógenas fúngicas que habitan en los tejidos vivos de las plantas vasculares en la zona del alto Ártico (Zhang y Yao, 2015). Los rasgos bioquímicos estudiados para estos aislamientos, también sugieren que no son la misma especie, ya que también se encontraron diferencias evidentes entre los miembros del mismo género. La plataforma Heatmapper, permite la clasificación de grupos dependiendo de la tendencia de los resultados. En este caso, claramente se observa el comportamiento diferente entre bacterias y levaduras y entre levaduras mismas, la clasificación de resultados fue consistentes con el género correspondiente de cada cepa. Podemos ver como las *Rhodothorulas*, *Mrakias* y *Naganishia*, muestran comportamientos equiparables entre los aislados de su mismo género, pero diferentes entre géneros, y más diferentes aún con los aislados bacterianos. Sin embargo, a nivel de cepa, destacan las particularidades también.

Después del nitrógeno, el fosfato es el segundo nutriente limitante para el crecimiento de las plantas. Algunos microorganismos tienen la capacidad de mineralizar el fosfato a partir de fuentes orgánicas (ácidos húmicos) y solubilizar las fuentes inorgánicas, proporcionando así a la planta una fuente de fosfato apropiada (Richardson y Simpson, 2011). Todas las cepas bacterianas caracterizadas en este trabajo solubilizaron el fosfato; a la inversa, entre las cepas de levadura aisladas, sólo las pertenecientes al género *Mrakia* pudieron hacerlo, de ahí su importancia en el hábitat.

Se han aislado cepas de *Mrakia* de otros ambientes fríos y también se ha reportado la solubilización del fosfato para este género (Meena y otros, 2015; Yadav y otros, 2015; Singh y Singh, 2011). Esto puede jugar un papel fundamental en el hábitat volcánico, donde el fosfato apenas está biodisponible (Neall, 2009).

La secreción de enzimas hidrolíticas y remodeladoras de la pared celular, como las quitinasas y las celulasas son mecanismos importantes para mejorar la colonización de las plantas y para protegerse contra algunos oomicetos patógenos como *Phytophthora* y *Phytium*, cuyas paredes celulares contienen celulosa (Behera et al., 2017) y otros hongos con una pared celular de quitina. La actividad de la quitinasa y de la CMCasa fue casi exclusiva de los

aislados de levaduras, con la excepción de la cepa bacteriana Ps4 que exhibió actividad de CMCasa a 30 °C y la Ps3, que mostró actividad de quitinasa a 15 °C. Cabe destacar que las cepas de *Mrakia* sólo mostraron actividades hidrolíticas (quitinasa y proteasa) a 15 °C; no se detectó actividad de xilanasas o de CMCasa en estas cepas. Las cepas que manifestaron actividad de quitinasa fueron las que inhibieron el crecimiento de hongos de manera más eficiente. Sin embargo, la cepa *Naganishia sp.*, por ejemplo, no produjo esta actividad, pero mostró ser efectiva contra *Fusarium*, *Phytophthora* y *Alternaria*, lo que puede atribuirse a la competencia de los nutrientes más que a una verdadera toxicidad para el fitopatógeno.

Sorprendentemente ninguna de las cepas fue capaz de competir eficientemente contra *R. solani*, donde sólo se logró un 28% de inhibición del crecimiento por parte de las cepas Ps1, Ps2 y Ps3.

La producción de IAA fue detectable entre todas las cepas probadas, sin embargo, las cepas Rh1, Rh2 y Ps4 fueron capaces de producir entre 20-30 µg/mL de IAA, cuando el medio de cultivo fue suplementado con triptófano. Estas cantidades de IAA pueden ser perjudiciales para el crecimiento de las plantas (Persello-Cartieaux y otros, 2001, 2003; Xie y otros, 1996); sin embargo, estas cepas muestran un potencial biotecnológico para la producción de IAA que se utiliza en la agricultura como enraizador o herbicida.

Todas las cepas aisladas en general, aceleraron la tasa de germinación de semillas de *S. lycopersicum* a 22 °C, condiciones óptimas del modelo vegetal. El efecto fue similar cuando las semillas se incubaron a 15 °C, sin embargo, la germinación en general fue más lenta que a 22 °C y ligeramente acelerada cuando las semillas estaban inoculadas con algunas de las cepas. Por ejemplo, el día dos, el 26% de las semillas habían germinado en las placas donde se había inoculado el Mr1 a 22 °C.

A 15 °C, Mr1 y Rh4 también aceleraron la germinación. Es interesante que ambas cepas, junto con Ng1 y Rh1, aumentaron el porcentaje de germinación por encima del 90%, en comparación con el 78% que alcanzaron las semillas control (no inoculadas) al día 16.

Cuando las plántulas fueron cultivadas en frascos, se observaron resultados positivos en ambas temperaturas probadas, mostrando un aumento en la longitud de tallos y peso seco de plántulas tratadas con las cepas Rh1, Rh2 y Ng1 principalmente, en ambas temperaturas. Aunado a los resultados experimentales, también se observaron plantas testigo que desarrollaron tallos curvos y hojas enrolladas, consideradas como parte de estrategia de supervivencia cuando las plantas se enfrentan a situaciones de estrés (Benavides, 2002), mientras que las plantas tratadas con algunos aislados, Rh2 y Ng1, por ejemplo, mostraron tallos erguidos y hojas turgentes en ambas condiciones de incubación. Estos efectos positivos se deben probablemente a la producción microbiana de compuestos similares a las auxinas que estimulan la iniciación y el alargamiento de las raíces y los tallos (Meena et al., 2015), o bien por acción de giberelinas, que se sabe, juegan un papel fundamental en la germinación y alargamiento de los tallos (Achar P. et al. 2009), además de involucrar probablemente algún modulador de hormonas relacionadas a estrés. Efectos similares, se observaron sobre plantas que crecieron en condiciones de invernadero desde el inicio de la fase vegetativa,

hasta el inicio de la etapa reproductiva, cuando éstas fueron inoculadas con las cepas de levaduras Ng1 y Rh2, donde se apreciaron tallos más largos respecto a las plantas control. Coincidiendo con las observaciones en frascos, cuando las plantas de invernadero fueron sometidas a estrés por baja temperatura en el cuarto frío a 2 °C, se apreciaron tallos y hojas turgentes por más tiempo respecto a las plantas control.

Los microorganismos adaptados al frío aislados del volcán Xinantécatl mostraron características bioquímicas similares de promoción del crecimiento vegetal similares a los aislados de otros ambientes de gran altitud y fríos, como los glaciares de los Andes venezolanos (Balcazar et al., 2015) y el Himalaya (Selvakumar et al., 2010).

Pseudomonas spp. Aisladas de los Andes venezolanos exhibió capacidad para solubilizar fosfatos inorgánicos a bajas temperaturas, producir fitohormonas y sideróforos e inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Balcazar et al., 2015).

En comparación con las bacterias, los hongos han sido subexplorados por sus propiedades como biofertilizantes, ya que sólo las especies *Trichoderma* y *Mycorrhiza* han sido estudiadas a fondo. En particular, las levaduras como PGPM (Plant Growth Promoting Microorganism) no se han explorado ampliamente y, en consecuencia, se sabe muy poco sobre sus funciones ecológicas en el campo. Sin embargo, en algunos trabajos se ha descrito el potencial de las levaduras como PGPM porque pueden sintetizar compuestos similares a la IAA, solubilizar fosfatos inorgánicos, excretar sideróforos y producir enzimas funcionales con actividad en hongos fitopatógenos/omycetes, como *Glomerella cingulate*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp. y *Phytophthora infestans* (Fu et al, 2016; Ignatova y otros, 2015; Nour y Hager, 2015). En otros estudios se ha reportado que el tratamiento de semillas con levaduras aumenta la tasa de germinación, la longitud del tallo y la biomasa de las plántulas (Ignatova et al., 2015; Ch y Qi, 2013; Agamy et al., 2012; Amprayn et al., 2012; Nassar et al., 2005). Además, Nour y Hager, 2015 evaluaron varias levaduras promotoras del crecimiento vegetal (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* y *R. mucilaginosa*) como biofertilizantes y agentes de biocontrol, y llegaron a la conclusión de que la inoculación de *C. tropicalis*, además de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*, potenciaba significativamente el crecimiento de las plantas de *Vigna unguiculata* y reducía la infección por hongos fitopatógenos.

CONCLUSIONES

Las observaciones realizadas durante este trabajo, resaltan la importancia del estudio y prospección de levaduras como promotores del crecimiento vegetal, y aporta antecedentes que deberán estudiarse a fondo para entender los mecanismos de acción de estos organismos como agentes biofertilizantes, fitoestimuladores y fitoprotectores. Se considera necesario realizar investigaciones adicionales sobre los mecanismos de interacción y comunicación que ocurre entre las plantas y las levaduras, a nivel fisiológico y molecular. Las levaduras Rh2 del género *Rhodotorula*, y Ng1 del género *Naganishia*, serían buenos modelos para estudiar

la interacción con plantas en ambientes cálidos y templados, mientras que la cepa Mr1, del género *Mrakia*, puede conducir investigaciones sobre cultivos de clima frío. El análisis de dichas interacciones será pertinente para determinar si los microorganismos extremófilos desarrollan estrategias aún no descritas de promoción del crecimiento vegetal y si estas estrategias se comparten o complementan los mecanismos para disminuir los daños causados por estrés biótico y ambiental.

REFERENCIAS

Abeles F, Morgan P, Saltveit M Ethylene in Plant Biology. 2a. ed. *Academic Press*.1992. San Diego, C.A. 414 p.

Achard P., Genschik P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* 2009. 60, 1085–1092.

Adesemoye AO, Torbert HA and Kloepper JW. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 2009. 58:921-929.

Ahmed S. Agriculture–fertilization interface in Asia issue of growth and sustainability, Oxford and IBH publishing Co. 1995. New Delhi

Andrews J and Harris R. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol.* 2003. 38:145–180

Balcazar W, Rondón J, Rengifo M, Ball MM, Melfo A, Gómez W, Yarzabal LA. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiological research.* 2015. 177: 1-7.

Berg G, Zachow C, Müller H, Phillips J, Tilcher R. Next generation bio products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy.* 2013. 3: 648-656.

Blum A. ‘Plant breeding for stress environments.’ CRC Press. 1988. Boca Raton, FL.

BOLAÑOS, A. Introducción a la Olericultura. Primera Edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2001

Cheng Z, Park E, Glick BR. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can J Microbiol* 2007. 53:912–918

Coelho D, Dale R.. An energy-crop growth variable and temperature function for prediction. 1980

D’Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms : Challenge for life.. *EMBO. Rep.* 2006. 7(4): 385-389

Davies, P. J. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology* [en línea]edit. *Springer Netherlands.* 1995. Dordrecht, ISBN 978-0-7923-2985-5, springer.com/10.1007/978-94-011-0473-9.

De Palma M, Salzano M, Villano C, Aversano R, Lorito M, Ruocco M, Docimo T, Piccinelli A, D’Agostino N, and Tucci M.. Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. *Horticulture Research.* 2019.6:5 DOI 10.1038/s41438-018-0079-1.

Deepak B, Mohammad WA, Ranjan KS and Narendra T: Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories.* 2014, 13:66.

Des Marais D L, T E Juenger Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1206:56-79. 2010.

Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Büchel G and Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol.* 2009. 5:687-1696.

Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z and Lugtenberg B: High incidence of plant growth stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ Microbiol.* 2008, 10: 1-9.

Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R y Huante P. Importancia agrobiotecnológica de la enzima acc desaminasa en rizobacterias, una revisión.. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013. Vol. 36 (3): 251 – 258.

Fender J.E., Bender C.M., Stella N.A., Lahr R.M. Kalivoda E.J. Shanks R.M.Q. *Serratia marcescens* quinoprotein glucose dehydrogenase activity mediates medium acidification and inhibition of prodigiosin production by glucose. *Applied Environmental Microbiology.* 2012. 78: 6225–6235.

FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). Panorama Agroalimentario. Tomate Rojo. 2016.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroalimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf

Foolad MR, Lin GY. Relationship between cold tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato: analysis of response and correlated response to selection. *J Am Soc Hortic Sci.* 2001; 125:679–683.

Fu SF, Sun PF, Lu HY, Wei JY, Xiao HS, Fang WT, Cheng BY, Chou JY. Plant growth promoting traits of yeast isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal biology.* 2016. 120: 435- 448.

Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J. Cold- adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2000. 18: 103-107.

Glick BR, Penrose DM, Jiping L. A model for the lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol.* 1998. 190:63–68

Gomes ECQ, Godinho VM, Silva DAS¹, de Paula MTR¹, Vitoreli GA¹, Zani CL, Alves TMA, Junior PAS, Murta SMF, Barbosa EC, Oliveira JG, Oliveira FS, Carvalho CR¹, Ferreira MC, Rosa CA, Rosa LH: Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles.* 2018 doi: 10.1007/s00792-018-1003-1

Grover M, Ali SKZ, Sandhya V, Rasul A and Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agricultura Crops to abiotic stresses. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011. 27:1231-1240.

Hedden, P., & Phillips, A. L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 2000. 5, 523–530. doi:10.1016/S1360 1385(00)01790-8

Hu QP and Xu JG. 2011. A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(25), pp. 4321-4327.

Ignatovaa LV, Brazhnikova YV b, Berzhanovaa RZ, Mukashevaa TD. . Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. *Microbiological Research*. 2015. 175:2015 78–83

Katiyar V, Goel R. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol Res*. 2003. 158:163–168

Khan A.A., Jilani G., Akhtar S.M., Naqvi-Saqan M., Rasheed, M. Phosphorus solubilizing bacteria, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 2009. 48- 58.

Kloepper JW, Leong J, Teintze M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*. 1980 286:885–886.

Kottmeier ST and Sullivan CW Bacterial biomass and production in pack ice of Antarctica marginal ice age zones. *Deep Sea Res*. 1990.37:1311–133

Kumar A, Maurya B R, and Raghuwanshi R: Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum L*). *Biocatal. Agric. Biotechnol*. 2014. 3: 121- 128.

Lavania M, Chauhan PS, Chauhan SVS, Singh HB, Nautiyal CS. Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr Microbiol*. 2006. 52:363–368

LeBoeuf J. 2004. The effect of extreme temperatures on the tomato and pepper crops. http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/info_tomtemp.htm_2004

Leveau, J. H. J. y Lindow, S. E. “Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290”. *Applied and Environmental Microbiology*. . 2005 vol. 71, no. 5, pp. 2365 2371, ISSN 0099-2240, 1098-5336, DOI 10.1128/AEM.71.5.2365- 2371.2005, PMID: 15870323.

Luna P, Montero A, Junco R. Las Aguas Celestiales. Nevado de Toluca. INAH. 2008. México. Pp:1, 3, 7-9.

Lynch J. The rhizosphere. *Wiley-Interscience*, Chichester. 1990. 458 p.

Martorell MM Mauro L, Fernández PM, Castellanos LI, Mac Cormack WP. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *J Basic Microbiol*. 2017; 9999:1–13

Masalha J, Kosegarten H, Elmaci O, Mengel K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soil*. 2000. 30:433–439

McBeath J. Cold tolerant *Trichoderma*. 1995. US Patent #5,418,165

Megali L, Glauser G and Rasmann S: Fertilization with beneficial microorganism decreases tomato defense against insect pests. *Agro Sustain Dev*. 2013. Doi: 10.1007/s13593-013-0187-0.

Mishra P.K., Joshi P, Bisht S.C., and Bisht J.K.: Cold-Tolerant Agriculturally Important Microorganisms. *Microbiology Monographs*. 2010. 18, DOI 10.1007/978-3-642-13612-2_12.

Mishra PK, Mishra S, Bisht SC, Selvakumar G, Kundu S, Bisht JK, Gupta HS. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas. *Biol Res*. 2009. 42:305–313

Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, Bisht SC, Bisht JK, Gupta. Characterization of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. *Ann Microbiol*. 2008. 58:561–568

Navarro Farías, E.. Física de suelos: con enfoque agrícola, . Editorial Trillas. 1994. 195 pp. México

Neilands JB. Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem*. 1981. 50:715–731

Neilands JD. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*. 1995. 270:26723–26726

Nguyen C, Yan W, Tacon FL, Lapeyrie F. Genetic viability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicatyotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD Orton. *Plant Soil*. 1992. 143:193–9.

Panorama agropecuario en Morelos. Censo Agropecuario 2007 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México: INEGI, 2013.

Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*. 2002. 68:3795–3801

Penrose, D. M. & Glick, B. R. Technical focus Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*. 2003. 118, 10-15.

Ploeg A van der, Heuvelink E. Influence of sub-optimal temperature on tomato growth and yield: a review. *J Hort Sci Biotechnol*. 2005. 80:652–659

Řezanka T, *, Kolouchová I, Sigler K. Lipidomic analysis of psychrophilic yeasts cultivated at different temperatures. *Biochimica et Biophysica* .2016. Acta 1861 1634–1642.

Robinson CH. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New phytol*. 2001. 152: 341-353.

SAGARPA. Planeación Agrícola Nacional 2017- 2030. Jitomate. <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/planeacion-agricola-nacional-2017-2030-126813>

Sambrook J, Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press. 2001.

Sameen Ruqia Imadi, Alvina Gul Kazi, Mohammad Abass Ahanger, Salih Gucl and Parvaiz Ahmad. Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. *Journal of Genetics*. 2015 Vol. 94, No. 3.

Schmidt S, Vimercati L, Darcy JL, Arán P, Gendron EM, Solon AJ, Porazinska D, Dorador C. A *Naganishia* in high places: functioning populations or dormant cells from the atmosphere?. *Mycology*. 2017. Vol. 8 No. 3: 153-163.

Selvakumar G, Joshi P, Nazim S, Mishra PK, Kundu S, Gupta HS. Exiguobacterium acetylicum strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009. 25:131–13.

Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Gupta AD, Nazim S, Mishra PK, Gupta HS. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008a 24:955–960.

Selvakumar G, Mohan M, Kundu S, Gupta AD, Joshi P, Nazim S, Gupta HS. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Lett Appl Microbiol.* 2008b. 46:171–175

Selvakumar G., Kundu S., Piyush J., Sehar N., Gupta A. D., Gupta H.S. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. *Indian J Microbiol.* 2010. 50: 50-56. DOI: 10.1007/s12088-009-0024-y

SFA (Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios). Monografía de Cultivos. Jitomate. 2010

Sinha RK, Valani D, Chauhan K and Agarwal S: Embarking on a second green revolution for sustainable agriculture by vermiculture biotechnology using earthworms: reviving the dreams of Sir Charles Darwin. *Int J Agric Health Saf.* 2014, 1: 50-64.

Subramanian P, Kim K, Krishnamoorthy R, Mageswari A, Selvakumar G, Sa T. Cold Stress Tolerance in Psychrotolerant Soil Bacteria and Their Conferred Chilling Resistance in Tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under Low Temperatures. *PLOS ONE.* 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0161592.

Tan K C, Ipcho Svs, Trengove Rd, Oliver Rp , Solomon Ps. Review. Challenges for molecular plant pathology over the next ten years. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Molecular Plant Pathology.* 2009. 10 (5), 703–715.

Thomas-Hall, • Turchetti B, • Buzzini P, • Branda E, Boekhout T, Theelen B, Watson K. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. Nov. *Extremophiles.* 2010. 14:47–59 DOI 10.1007/s00792-009-0286-7

Tsuji M, Fujiu S, Xiao N, Hanada Y, Kudoh S, Kondo H, Tsuda S, Hoshino T. Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. *FEMS Microbiol.* 2013. Lett.346, 121–130. DOI:10.1111/1574-6968.12217.

Tsuji M. Cold-stress responses in the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *R. Soc. open sci.* 2016.3: 160106. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160106>

Turchetti B, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C, Onofri A, Buzzini P. Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol.* 2013. 86(2):327-40

Valerio M. Impacto de temperaturas extremas en el tomate. <https://www.hortalizas.com/horticultura-prottegida/impacto-de-temperaturas-extremas-en-el-tomate/>. 2012

Vega-Celedón P, Canchignia Martínez H, González M y Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. 2016. *Cultivos Tropicales.* 2016. vol. 37, no. especial, pp. 33-39

Volkmar KM, Bremer E. Effects of seed inoculation with strain of *Pseudomonas fluorescens* on root growth and activity of wheat in well-watered and drought stressed grass-fronted rhizotrons. *Can J Plant Sci.* 1998. 78:545–551

Wang C, Knill E, Defago G. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol.* 2000. 46:898–90

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.. *Nat Rev Genet.* 2009. 10(1): 57–63. doi:10.1038/nrg2484.

Youssef MMA and Eissa MFM: Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. *E3 J Biotechnol. Pharm Res.* 2014. 5: 1-6.

Youssef MMA, Eissa MFM. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. *E3 J. Biotechnol. Pharm.* 2014. Res., 5: 1:001-006. g maize growth and development: planting to silking. *Agronomy Journal* 72: 503–510

Yuivar Y, Barahona S, Alcaño J, Cifuentes V, Baeza M. Biochemical and Thermodynamical Characterization of Glucose Oxidase, Invertase, and Alkaline Phosphatase Secreted by Antarctic Yeasts. *Front Mol Biosci.* 2017. 4:86. DOI: 10.3389/fmolb.2017.00086

APÉNDICES Y ANEXOS**Apéndice 1. Medios de cultivo.****Agar Dextrosa Papa (PDA)**

Marca Difco TM.

Preparación 39 g /L

La fórmula por litro contiene:

Almidón de papa 4.0 g

Dextrosa 20.0

Agar 15.0 g

Caldo Papa Dextrosa (PDB)

Preparación 24 g/L

La fórmula por litro contiene:

Almidón de papa 4.0 g

Dextrosa 20g

NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium)

La fórmula por medio contiene:

Glucosa 10g

Ca₃(PO₄)₂, 5g

MgCl₂-6H₂O, 5g

MgSO₄- 7 H₂O, 0.25 g

KCl, 0.2g

(NH₄)₂SO₄, 0.1 g

Murashige and Skoog (MS), basal

Marca Sigma-Aldrich

Preparación 4.3 g/L

*Agar para medio sólido, 8 g

YPD (Yeast Extract -Peptone-Dextrose)

Preparación por litro

Extracto de levadura 10g

Peptona 20g

Dextrosa 20g

*Agar para medio sólido, 20g

Luria- Bertani (LB)

Preparación en un litro

Triptona, 10g

NaCl, 10g

Extracto de levadura, 5 g

*Agar bacteriológico, 12 g

Méδιο mínimo Vogel's

Para un litro de medio

KH_2PO_4 , (Anhidro) 5g

NH_4NO_3 (Anhidro), 2 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.2g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.1g

Agua destilada.

Elementos traza (g/ 100 ml)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5 g

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.25 g

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05 g

H_3BO_3 (Anhidro), 0.05g

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.05g

Anexo 1. Secuencias de levaduras marcador molecular, D1-2; ITS3-4; LSU

D1-D2

>Seq. Rh1

GGATTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTC
 GGTGTCCGAKTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTTG
 GAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTGA
 TACATTTTTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTTGGGTGGTAAATTCAT
 CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAA
 AGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTC
 AGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATG
 GTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTTCGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGG
 ACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTKGSSGGGKTTYCRACYCTTCMCMYTWAGRAKGYKG
 KGR

>Seq. Rh2

TAGGTATTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACC
 TTCGGTGTCCGAKTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTG
 TTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTG
 TGATACATTTTTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTTGGGTGGTAAATTC
 CATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATG
 AAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAA
 GTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATA
 ATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGG
 GGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTTGGCGGGGGTTTTCGACCTCTTCACACTTAGGATG
 CTGGTGGAAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGACMCGGGGAMCMAAAAAA

>Seq. Rh4

CAGCATCGCCTAGTAGCGGCGAGCGAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTT
 CGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAWTGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACMWRTCTGTT
 GGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTG
 ATACATTTTTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTTGGGTGGTAAATTC
 TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA
 AAGCACTTTGGAAAGARAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAART
 CAGACTTGCTTGCCKAGSAATCKGKTTGCMGGSCAGCATCRRTTTTCCGGGATGGATAAT
 GGTAKAGAGAAGGTAGCAGTTTCRGCTGTGTTATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGG
 GACTGASGAACGCARTGTGCCTTTTGGCGGGGGTTTTCRACCTCTTCACWCTTAGRAKGYK
 GKGRAWGGGCTTTAAMCGACCKTCTTGCMCCGGGGAACCAAAA

>Seq. Ng1

GCTTATGTCACATCCTAAGCATGTACGTGGACGAATCCCAGCCATAAAGGCATGCTGCGTT
 CCTCAGTCCCAATCAATGTATATGACGCTAGGCTATAAGTTCACCCGAGAGTGCTACCTTC
 CTAGTGCCTTTATCCATCGATCAAAACTGATGTTGACCCACTCAATGATATAAATACCAA
 AGAGCATGACTGACTTCAATCGTTTCCCTTCAACAATTTACGTAAGTTAACTCTCTT
 TCCAAAGTGCTTTTCATCTTCCCTCACGGTACTTGTTGCTATCGGTCTCTCGCCAATAT
 TTAGCTTTAGATGGAATTCACCACCCATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTT
 GAAAGTGTATCACAGAGACCCGGGGTCCATGTCAAGGACGGGATTCTCACCTCTATGAC
 GCCCTGTTCCAAGGGACTTGTACATGGGCCGGCACGGAAAACACTTCTAGATTACAACT
 CGAGCAGCCGAAGGCTACTAGATTTCAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCACTCGCCGTTACT
 AGGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTCTCCGAAGCCAATAMMMATA

>Seq. Rh4

CYATCACAGCATCCTAAGTGTGAGAGTTCGAAACCCCGCCAAAAGGCACMCTGCGTYCC

KCARTCCCCAARATGTATCCAGMAAARAGCTATAACACAGCCRAAMCTGCTMCCTTCTC
TCTACCATTAYCCWTCCTCGGAAAAGTATGCKGGCKGMAAACCGATTGCTCGGCAAGCA
AGTCTGACTTCAAGCGTTTCCCTTCCAMCAWTTTTCMCGWMYTGTTAACTCTCTTCCAAA
GTGCTTTTCATCTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGC
TTTARATGGAATTTACCACCAATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTGACTCTTCRAAA
AKGTATCACAAGCGYTGCGGCTCCSCACCAWATACGGGGGYCYMCCACTATGCCSCTG
TATTCCAACARACTTGKGTGCGGYCCAMCSCGAAAACATTTCTAGARATTACAACTCGA
ACMCCRAAGGKCCRAATTATAAWTTKGASYTCTTCCSGYTTCSYTCGCCSYTMCWAGGG
RAATCCTGGTKAKTTYCTTTTCCCTCCGCTTTKGRWWWKSA

>Seq.Mr1

GMTWTGCAGCATCCTAAGCGCGTATGTACCCGAGGGCCAACCAATAAAGGGCGCGCTGC
GTTCTCAGYCCCGCTATGTATTCGAAGGAGGGCTATAACACATCCGAGGATGCCACG
TTCCCTCCAACCTTTTCCACAGATCGAAACTGATGCTGGCCTGCAAACCGAGAAGTACAC
CGACAGAATCGGCTGAGTCTCGGAAAGCATGACTGACTTCAATCGTTTCCCTTTAACAA
TTTACGTAAGTCTTTTCAAAGTCTTTTTCATCTTCCCTCACGGTACTTG
TTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCATTTTGGAGC
TGCATCCCAAACAACCTGACTCTTCGAGATCGCATCACAAGCATTGGTAGTCTGTGTC
AAGGACGGGATTCTCACCTCTATGACGCCCTGTTCCAAGGGACTGTACACAGGCCAAC
GCGGAAAACGATTCTCTAGACTACAACCTGTAACCTGAGGCTGCAAGATTTAAATTT
GAGCTCATCCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTT

ITS

>Seq.Rh1

GCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCTACCTGATTTGAGATCTAATCTTAAAATGTAGACATTC
TGATTAGAAGCTTCTTTAACCCAACCCGGCTCTAGTCCGAAGACTAGAATTCCTCAGCG
AATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCGAAGTTTCGATTGCGGATGCTAATGCATTACGAAC
GAGCTAGACCGTAAAGGCCAGCAGCGCTCAGAAAACAAACACCTTCTCAATCATTAAAGAA
AGAGGAGGGTTGAAGTATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCACGGAATACCATGGAG
CGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATT

>Seq. Rh2

GTGATTGAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCG
TGGAGCATGCCTGTTTGTGATGTCATGAATACTTCAACCCTCCTTTCTTAATGATTGAAG
AGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTAGGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGC
ATCCGCAATCGAATTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTC
TTCGGACTAGAGCCGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAGAA
TTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

>Seq.Rh4

ATTGAGAATTCGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTG
GAGCATGCCTGTTTGTGATGTCATGAATACTTCAACCCTCCTTTCTTAATGATTGAAGAG
GTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTAGGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCAT
CCGCAATCGAATTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTT
CGGACTAGAGCCGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAGATT
AGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

>Seq.Ng1

GTGATTGAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCCTGGTATTCCG
GGGAGCATGCCTGTTTGTGATGTCATGAAAACCTCAACCTTAGATTGGTTAACACCTTTCT
TTGGCTTGGATTTGGACGTTTCCGATGATAAGTCGGCTCGTCTTAAAAGTAATAGCTGGA
TCTGTCTCGCGACATGGTTTACTTGGCGTAATAAGTATTTTCGTAAGGACATCTTCGGAT
GGCCGCTTGAAGACTAAAGACCGCTTTCTAATCCATTGATCTTCGGATTAATATTCTTG
ACATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

>Seq.Rh4

TGTGATTGAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCC
 GTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAATACTTCAACCCTCTTTCTTAATGATTGAA
 GAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAG
 CATCCGCAATCGAATTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGT
 CTTCGGACTAGAGCCGGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAG
 ATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAGGCGGAGGA
 >Seq.Mr1

GTGATTGAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCTTTGGTATTCCG
 AAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAACTCTCAACCCTCAACTTTCTTAATAGTCGGTT
 GCGGCTTGGACTTGGAGCGCTGCTGGTCTTTATTGACCGCTCGCTTGAAATGAATTAGCA
 GATCCTTTTTGTAATCGGTTCCACTCGACGTGATAAGTATTTGCGCGAGGACATCTTAACG
 GATGGCCGAGATAAAGAAAGTCTTTAGATCCGCTTCTAATCCTTAGATAGAGCTTGCTCTA
 CTAACCCCTTTTATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA
 TCA

>Seq.Mr2

TTGTGATTGAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCC
 GAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAACTCTCACCTCCAACCTTTCTTAATAGTGGTTG
 GAGGCGTGGACTTGGAGCGTTGCTGGTTTTTATTAACCGGCTCGCTTGAAATGAATTAGCAGA
 TCCTTTTTGTAATCGGTTCCACTCGACGTGATAAGTATTTGCGCGAGGACATCTTAACGGAT
 GGCCGAGATAAAGAAAGTCTTAGATCCGCTTCTAATTCTTAGCTTTACGCAAGTAACTAAA
 CCCATTTTATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

>Seq.Mr3

GTGATTGAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAG
 GAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAACTCTCACCTCCAACCTTTCTTAATAGTGGTTGGAGG
 CGTGGACTTGGAGCGTTGCTGGTTTTTATTAACCGGCTCGCTTGAAATGAATTAGCAGATCCTT
 TTTGTAATCGGTTCCACTCGACGTGATAAGTATTTGCGCGAGGACATCTTAACGGATGGCCGA
 GATAAAGAAAGTCTTAGATCCGCTTCTAATTCTTAGCTTTACGCAAGTAACTAAACCCATT
 TATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATACA

>Seq.Mr2 (ITS)

ATCGAGAGCGTCTTATTGACCTCTCACCTTCACATCCACATACACCCTGTGAATCGTTT
 GGCTTTTCATTAACAGAGCGCAAGCTCGACGAGTAAAAGTCATCATTTATACATACCCC
 AGTCTTATGAATGTAACAGTTTTAATAACATAATAAACTTTTAACAACGGATCTCTTG
 GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
 GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
 TTTGAGTGTGCATGAACTCTCACCTCCAACCTTTCTTAATAGTGGTTGGAGGCGTGGACT
 TGAGCGTTGCTGGTTTTTATTAACCGGCTCGCTTGAAATGAATTAGCAGATCCTTTTTGT
 AATCGGTTCCMCTCGACGTGATAAGTATTTGCGCGAGGACATCTTAACGGATGGCCGAGA
 TAAAGAAAGTCTTAGATCCGCTTCTAATTCTTAGCTTTACGCARGTAACTAAACCCATT
 TTATGATCTGGSCTCAAATCAGGTAGGACTACCCSCTGAAATTAWGCATATCAATAAKCG
 GAGGAAGA

>Seq.Mr3 (ITS)

ATCGAGAGCGTCTTATTGACCTCTCACCTTCACATCCACATACACCCTGTGAATCGTTT
 GGCTTTTCATTAACAGAGCGCAAGCTCGACGAGTAAAAGTCATCATTTATACATACCCC
 AGTCTTATGAATGTAACAGTTTTAATAACATAATAAACTTTTAACAACGGATCTCTTG
 GTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
 GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
 TTTGAGTGTGCATGAACTCTCACCTCCAACCTTTCTTAATAGTGGTTGGAGGCGTGGACT
 TGAGCGTTGCTGGTTTTTATTAACCGGCTCGCTTGAAATGAATTAGCAGATCCTTTTTGT
 AATCGGTTCCACTCGACGTGATAAGTATTTGCGCGAGGACATCTTAACGGATGGCCGAGA
 TAAAGAAAGTCTTAGATCCGCTTCTAATTCTTAGCTTTACGCAAGTAACTAAACCCATT

TTATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG
GAGGAA

LSU

>Rh1

GGATTCATTAGCAGATCTGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATC
TGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTG
GACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCCG
TATATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAA
ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAA
AGCACTTTGGAAGAGAGTAAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAAC
GCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGAGGCCAGCATCA
GTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCTGTGT
TATAGCTCTCTGCTGGATACATCTTGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCC
TTTTGGCGGGGTTTCAACTTCTTCACTTAGAAGGCTGGTGAAGGGC
TTAAACAACCCGCCTTGAACACCGGACCAAGGATTCTAACAGGCTGGCA
AGTATTTGGTTGTCAAACCGAAGGCGTAATGAAATTGAAGGGAGGTGGG
AACCGCAGGGTGACCATCGACCGAATCTGGAATTTTAATGGATGGATT
TGAGTAAGAACCACGTATGTTGGGACCCGAAAGAATGGTGAAACTA

>Rh2

GGATTCCTTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATC
TGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGG
ACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCCGTA
TATGGTGCGGACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATAT
TGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCAC
TTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGA
AGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGTTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCC
GGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTC
TCTGCTGGATACATCTTGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTTGGCGG
GGTTTTCGACCTCTTCACTTAGGATGCTGGTGAATGGCTTTAAACGAC
CCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCTTGCGAGTATTTGGGT
GTCAAACCCGGATGCGTAATGAAAGTGAATGGAGGTGGGAACCGCAAGGTG
CACCATCGACCGATCTGGATTTTAATGATGGATTTGAGTAAGAGCACGTA
TGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAATATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAG
GAAACTCTGGTGAGGCTCGTAGCGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAA
ATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCTG
CG

>Rh3

CCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCA
CCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGC
ACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCCGTATATGG
TGCGGACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCG
AGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGG
AAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCA

GACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGAT
GGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTCTGC
TGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTTGGCGGGGGTT
TCGACCTCTTCACTTAGGATGCTGGTGAATGGCTTTAAACGACCCGTC
TTGAAACACGGACCAAGGATTCTAACATGCTTGCAATTTTGGGTGTCAA
ACCCGGATGCGTAATGAAATTGAATGGAGGTGGGAACCGCATGGTGCACCA
TCGACCGATCTGGATTGTAATGATGGATTTGAGTAAGAGCACGTATGTTG
GGACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAAC
TCTGGTGGAGGCTCGTAACGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCACATTTG
GGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCTCTAGTAGCTGGTCCGCAA

>Ng1

GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATC
TAGTAGCCTTCGGCTGCTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGTTTTCCGTGCC
GGCCCATGTACAAGTCCCTTGAACAGGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCC
GTCCTTGACATGGACCCCGGTGCTCTGTGATACACTTTCAACGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAATGGGTGGTGAATCCATCTAAAGCTAAA
TATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAG
CACTTTGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGA
TTGAAGTCAGTCATGCTCTTTGGTATTTATCATTGAGTGGGGTCAACAT
CAGTTTTGATCGATGGATAAAGGCACTAGGAAGGTAGCACTCTCGGGTGAA
CTTATAGCCTAGCGTCATATACATTGATTGGGACTGAGGAACGCAGCATGC
CTTTATGGCCGGGATTCGTCCACGTACATGCTTAGGATGTTGACATAATGG
CTTTAAACGACCCGCTTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATATCTGCG
AGTATTTGGGTGTCAAACCCGAGTGCGCAATGAAAGTGAACGTAGGAGCCA
CGCGCAAGCTGCAGCTTCGACCGATCTGGATCTTAGTGATGGATTTGAGT
AAGAGCATATATGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGAATAGGG
CGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGTGCAAA
TCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGT
AGCTGGTTCCTGCGA

>Rh4

GGATTCCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATC
TGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGG
ACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTA
TATGGTGCAGGACGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTGAAGAGTCGAGTTG
TTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATAT
TGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCAC
TTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGA
AGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGTTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCC
GGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTC
TCTGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTGGCGGG
GGTTTCGACCTCTTCACTTAGGATGCTGGTGAATGGCTTTAAACGACC
CGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCTTGCAGTATTTGGGTG
TCAAACCCGGATGCGTAATGAAAGTGAATGGAGGTGGGAACCGCAAGGTGC
ACCATCGACCGATCTGGATTTTAAATGATGGATTTGAGTAAGAGCACGTAT
GTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGG
AAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAA

TTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTC

>Mr1

GGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAATTTAAAATCTTGCAGCCTCAGGTTG
TACGAGTTGTAGTCTAGAGAATCGTTTTCCGCGTTGGCCTGTGTACAAGTC
CCTTGGAACAGGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCTTGACACAGACT
ACCAATGCTTTGTGATGCGATCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG
CTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG
ATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAAGAGAG
TTAAACAGTACGTGAAATTGTTAAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCATGC
TTTCCGAGACTCAGCCGATTCTGTGCGGTGACTTCTCGGTTTGCAGGCCAG
CATCAGTTTCGATCTGTGGAAAAGGTTGGAGGGAAACGTGGCATCCTCGGAT
GTGTTATAGCCCTCCTTGAATACATAGAGCGGGACTGAGGAACGCAGCGC
GCCCTTTATTGGGTTGGCCCTCGGGTACATACGCGCTTAGGATGCTGGCAT
AATGGCTTTAAACGACCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGT
TTGCGAGTGTGGGTGGTAAACCCGAACGCGTAATTAAGTGAATGCAGG
TGGGATCCGCAAGGAGCACCATCGACCGATCTGGATCTTTTGTGATGGATT
TGAGTAAGAGCACATATGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACATATGCCTGAA
TAGGGCGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGT
GCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCAT
CTAGTAGCTGGTCCTGCA

>Mr2

GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAATTTAAAATC
TTGCAGCCTCAGGTTGTACGAGTTGTAGTCTAGAGAATCGTTTTCCGCGTT
GGCCTGTGTACAAGTCCCTTGAACAGGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCC
GTCCTTGACACAGACTACCAATGCTTTGTGATGCGATCTCGAAGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAA
TATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAG
CACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTAAAAGGGAAACGA
TTGAAGTCAGTCATGCTCTCCGAGACTCAGCCGATTCTGTGCGGTGACTTC
TCGGTTGGCAGGCCAGCATCAGTTTCGATCTGTGGAAAAGGTTGGAGAGAA
TGTGGCATCCTCGGATGTGTTATAGCTCTTCTTGAATACATAGAGCGGGA
CTGAGGAACGCAGCGTGCCCTTTATTGGGTTGGCCTTCGGGTACATACAG
CTTAGGATGCTGGCATAATGGCTTTAAACGACCCGCTTGAACACGGACC
AAGGAGTCTAACATGTTTGCAGTGTGGGTGGTAAACCCGAACGCGTAA
TTAAAGTGAATGCAGGTGGGATCCGCAAGGAGCACCATCGACCGATCTGGA
TCTTTTGTGATGGATTTGAGTAAGAGCACATATGTTGGGACCCGAAAGATG
GTGAACATATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTC
GTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAA
AGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTCTGC

>Mr3

GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAATTTAAAATC
TTGCAGCCTCAGGTTGTACGAGTTGTAGTCTAGAGAATCGTTTTCCGCGTT
GGCCTGTGTACAAGTCCCTTGAACAGGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCC
GTCCTTGACACAGACTACCAATGCTTTGTGATGCGATCTCGAAGAGTCGAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAA
TATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAG

CACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTAAAAGGGAAACGA
TTGAAGTCAGTCATGCTCTCCGAGACTCAGCCGATTCTGTCGGTGTACTTC
TCGGTTGGCAGGCCAGCATCAGTTTCGATCTGTGGAAAAGTTGGAGAGAA
TGTGGCATCCTCGGATGTGTTATAGCTCTTCTCGAATACATAGAGCGGGA
CTGAGGAACGCAGCGTGCCCTTTATTGGGTTGGCCTTCGGGTACATACACG
CTTAGGATGCTGGCATAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGAAACACGGACC
AAGGAGTCTAACATGTTTGCGAGTGTGGGTGGTAAACCCGAACGCGTAA
TTAAAGTGAATGCAGGTGGGATCCGCAAGGAGCACCATCGACCGATCTGGA
TCTTTTGTGATGGATTTGAGTAAGAGCACATATGTTGGGACCCGAAAGATG
GTGAACTATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTC
GTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAA
AGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCTGCA

Anexo 2. Secuencias del marcador molecular, 16s, de bacterias aisladas del volcán Xinantécatl.

>PS1

ACTTTTCAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGT
TACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTC
GGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCG
GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAT
GTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCGG

>PS2

TGACTTTTCAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCCTTA
GTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
TCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTC
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCGG

>PS3

TCACTTTCCGAGATGGATGGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCCTTA
GTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
TCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTC
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTG

>PS4

CGTACTTTTCAGAGATGGATGGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGCCTT
AGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGT
CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG
AATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGA

Anexo 3. Alineamiento de secuencias de levaduras (parecidas entre sí) con el marcador ITS (azul); LSU (morado)

| Yeast Strains | Score | Expect | Identities | Gaps |
|-----------------------------|----------------|--------|---------------|-----------|
| Rh1 vs Rh2 (Rhodotorula) | 603 bits(326) | 3e-177 | 328/329(99%) | 0/329(0%) |
| Rh1 vs Rh3 (Rhodotorula) | 603 bits(326) | 3e-177 | 328/329(99%) | 0/329(0%) |
| Rh1 vs Rh4 (Rhodotorula) | 608 bits(329) | 7e-179 | 329/329(100%) | 0/329(0%) |
| Rh2 vs Rh3 (Rhodotorula) | 636 bits(344) | 0.0 | 349/351(99%) | 1/351(0%) |
| Rh2 vs Rh4 (Rhodotorula) | 647 bits(350) | 0.0 | 352/353(99%) | 0/353(0%) |
| Rh3 vs Rh4 (Rhodotorula) | 630 bits(341) | 0.0 | 348/351(99%) | 1/351(0%) |
| Mr1 vs Mr2 (Mrakia) | 558 bits(302) | 8e-164 | 346/367(94%) | 4/367(1%) |
| Mr1 vs Mr3 (Mrakia) | 558 bits(302) | 8e-164 | 346/367(94%) | 4/367(1%) |
| Mr2 vs Mr3 (Mrakia) | 673 bits(364) | 0.0 | 364/364(100%) | 0/364(0%) |
| Rh1 vs Rh2 (Rhodotorula) | 1201 bits(650) | 0.0 | 703/728(97%) | 6/728(0%) |
| Rh1 vs Rh3 (Rhodotorula) | 1206 bits(653) | 0.0 | 704/728(97%) | 6/728(0%) |
| | | | | |
| Rh1 vs Rh4 (Rhodotorula) | 1194 bits(646) | 0.0 | 702/728(96%) | 7/728(0%) |
| Rh2 vs Rh3 (Rhodotorula) | 1533 bits(830) | 0.0 | 849/858(99%) | 1/858(0%) |
| Rh2 vs Rh4 (Rhodotorula) | 1587 bits(859) | 0.0 | 862/863(99%) | 1/863(0%) |
| Rh3 vs Rh4 (Rhodotorula) | 1530 bits(828) | 0.0 | 849/859(99%) | 2/859(0%) |
| Mr1 vs Mr2 (Mrakia) | 1576 bits(853) | 0.0 | 874/884(99%) | 1/884(0%) |
| Mr1 vs Mr3 (Mrakia) | 1580 bits(855) | 0.0 | 875/885(99%) | 0/885(0%) |
| Mr2 vs Mr3 (Mrakia) | 1655 bits(896) | 0.0 | 899/900(99%) | 1/900(0%) |

Anexo 4. Cepas de bacterias (*Pseudomonas* sp). Alineamiento de secuencias con el marcador 16s

| Bacteria satrains | Score | Expect | Identities | Gaps |
|-------------------|---------------|--------|---------------|-----------|
| Ps1 vs Ps2 | 712 bits(385) | 0.0 | 385/385(100%) | 0/385(0%) |
| Ps1 vs Ps3 | 680 bits(368) | 0.0 | 378/383(99%) | 0/383(0%) |
| Ps1 vs PS4 | 686 bits(371) | 0.0 | 379/383(99%) | 0/383(0%) |
| Ps2 vs Ps3 | 680 bits(368) | 0.0 | 378/383(99%) | 0/383(0%) |
| Ps2 vs PS4 | 686 bits(371) | 0.0 | 379/383(99%) | 0/383(0%) |
| Ps3 vs PS4 | 708 bits(383) | 0.0 | 385/386(99%) | 0/386(0%) |

Anexo 5. Tabla de porcentajes de germinación. Las letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias estadísticas significativas determinadas por ANOVA de una vía, seguido de comparación múltiple de medias de Tukey, cuando $p \leq 0.05$. Experimento a 22 °C

| Cepas | Germinación de semillas (%) / día | | | | |
|---------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
| Rh1 | 0.0 ± 0.0 ^b | 40.0 ± 14.1 ^{ab} | 68.0 ± 12.4 ^{ab} | 90.0 ± 10 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Rh2 | 0.0 ± 0.0 ^b | 43.3 ± 7.1 ^{ab} | 80.3 ± 8.2 ^{ab} | 95.0 ± 5.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Rh3 | 0.0 ± 0.0 ^b | 52.7 ± 10.1 ^{ab} | 75.8 ± 9.2 ^{ab} | 84.3 ± 6.7 ^a | 95.8 ± 4.1 ^a |
| Rh4 | 0.0 ± 0.0 ^b | 60.4 ± 6.9 ^a | 86.3 ± 7.5 ^{ab} | 92.9 ± 4.4 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ng1 | 0.0 ± 0.0 ^b | 61.3 ± 8.8 ^{ab} | 89.2 ± 4.6 ^a | 97.1 ± 2.9 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Mr1 | 26.3 ± 13.3 ^a | 70.6 ± 7.5 ^a | 90.0 ± 5.8 ^a | 95.0 ± 5.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Mr2 | 0.0 ± 0.0 ^b | 57.1 ± 11.9 ^{ab} | 75.0 ± 15.0 ^{ab} | 95.0 ± 5.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Mr3 | 13.3 ± 6.6 ^a | 54.3 ± 12.1 ^{ab} | 81.3 ± 5.2 ^{ab} | 92.7 ± 4.5 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ps1 | 0.0 ± 0.0 ^b | 52.5 ± 5.9 ^{ab} | 95.0 ± 5.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ps2 | 0.0 ± 0.0 ^b | 57.1 ± 9.1 ^{ab} | 66.6 ± 8.5 ^{ab} | 88.0 ± 8.0 ^a | 95.0 ± 5.0 ^a |
| Ps3 | 0.0 ± 0.0 ^b | 48.2 ± 9.8 ^{ab} | 77.4 ± 5.6 ^{ab} | 94.3 ± 3.9 ^a | 98.3 ± 1.7 ^a |
| Ps4 | 0.0 ± 0.0 ^b | 47.3 ± 9.0 ^{ab} | 60.5 ± 8.9 ^{ab} | 88.0 ± 4.9 ^a | 95.0 ± 5.0 ^a |
| Control | 0.0 ± 0.0 ^b | 22.1 ± 3.5 ^b | 53.4 ± 4.0 ^b | 82.7 ± 9.1 ^a | 100 ± 0.0 ^a |

Anexo 6. Tabla de porcentajes de germinación. Las letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias estadísticas significativas determinadas por ANOVA de una vía, seguido de comparación múltiple de medias de Tukey, cuando $p \leq 0.05$. Experimento a 15 °C

| Cepas | Germinación de semillas (%) / día | | | | | | | | |
|---------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Día 10 | Día 11 | Día 12 | Día 13 | Día 14 | Día 15 | Día 16 | Día 17 | Día 18 |
| | | | 43.8 ± | | | | | | |
| Rh1 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 13.7 ^{ab} | 60.9 ^b ± 9.2 ^{ab} | 77.8 ± 9.0 ^a | 84.7 ± 7.3 ^a | 93.3 ± 6.7 ^a | 95.0 ± 5.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Rh2 | 0.0 ± 0.0 ^a | 6.6 ± 6.6 ^b | 43.6 ± 9.7 ^{ab} | 53.0 ± 7.2 ^{ab} | 72.0 ± 9.4 ^a | 75.3 ± 9.1 ^a | 85.8 ± 9.5 ^a | 100 ± 0.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Rh3 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 43.5 ± 11.8 ^{ab} | 45.2 ± 9.5 ^{ab} | 55.9 ± 12.4 ^a | 59.7 ± 9.1 ^a | 80.8 ± 8.2 ^a | 95.8 ± 4.2 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Rh4 | 6.6 ± 6.6 ^a | 21.7 ± 11.6 ^a | 63.6 ± 10.2 ^a | 76.2 ± 9.5 ^{ab} | 82.1 ± 6.9 ^a | 85.5 ± 7.8 ^a | 93.3 ± 6.6 ^a | 100 ± 0.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ng1 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 36.7 ± 8.0 ^{ab} | 48.5 ± 12.6 ^{ab} | 63.6 ± 9.0 ^a | 68.2 ± 8.4 ^a | 91.7 ± 8.3 ^a | 91.7 ± 8.3 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Mr1 | 6.6 ± 6.6 ^a | 20 ± 11.5 ^a | 71.1 ± 19.7 ^a | 82.2 ± 9.7 ^a | 87.8 ± 4.8 ^a | 85.0 ± 15.0 ^a | 95.0 ± 5.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Mr2 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 18.3 ± 10.7 ^{ab} | 42.2 ± 21.2 ^{ab} | 63.3 ± 3.3 ^a | 51.7 ± 10.7 ^a | 86.7 ± 8.2 ^a | 95.8 ± 4.2 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Mr3 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 26.3 ± 7.5 ^{ab} | 31.4 ± 7.9 ^b | 47.7 ± 8.8 ^a | 68.9 ± 9.2 ^a | 90.8 ± 5.3 ^a | 90.1 ± 5.3 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ps1 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 12.2 ± 6.2 ^b | 23.3 ± 14.5 ^b | 35.6 ± 15.6 ^a | 35.6 ± 15.6 ^a | 75.6 ± 4.4 ^a | 88.9 ± 11.1 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ps2 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 34.7 ± 5.5 ^a | 29.6 ± 9.2 ^b | 45.7 ± 11.0 ^a | 65.4 ± 17.2 ^a | 70.0 ± 19.1 ^a | 100 ± 0.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ps3 | 0.0 ± 0.0 ^a | 6.6 ± 6.6 ^b | 50.9 ± 16.1 ^{ab} | 50.6 ± 13.8 ^{ab} | 75.7 ± 7.0 ^a | 92.9 ± 3.2 ^a | 94.4 ± 5.5 ^a | 100 ± 0.0 ^a | 100 ± 0.0 ^a |
| Ps4 | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 13.17 ± 6.0 ^b | 20.6 ± 10.7 ^b | 38.3 ± 15.2 ^a | 48.7 ± 18.3 ^a | 60.0 ± 20.0 ^a | 80 ± 14.1 ^a | 93.3 ± 6.7 ^a |
| | | | 16.10 ± | | | | | | |
| Control | 0.0 ± 0.0 ^a | 0.0 ± 0.0 ^b | 10.5 ^b | 28.6 ± 11.5 ^b | 59.2 ± 23.6 ^a | 67.3 ± 16.8 ^a | 78.3 ± 15.2 ^a | 86.7 ± 8.2 ^a | 100 ± 0.0 ^a |



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL

Alumno que lo presenta a revisión: IRAN TAPIA VAZQUEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es APROBADO

ATENTAMENTE,

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha: 2020-05-21 15:13:42 | Firmante

IFggMCSRPVwQ0TUcB89ypZTixdAITeodM8L0G3CkTRWV0mggYh93YeeFuzRk+5VCzOAdPhZkdjguLR4GFPBUde1BUN5cp8h+pcpkAK7eRkMjmsCbY+OvgZhCbe3mrEukuYGMNV1FMHCHq8YDkYobjDgan6W6v6VfjU619VeeppoyAGUeAVYhu67epaxPD8akelAuC0x9mhoqZ+Phe8Ond85NPAGZdhoLj125+BB7CkUyJG8QZgawz0ZJ4+whK0W11pyDhNR2FFUT13VeeWYUcXdpPG8MTDh7VYhJ2VNB8EpUvd8qFu+Tz3B82bojg**

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



JXeqs71WQ3a

<https://efirma.uaem.mx/hc/Repudio/6xHLE3HBM518E0m0035aCLbW6aJC>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

**Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL**

Alumno que lo presenta a revisión: IRAN TAPIA VAZQUEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

**El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO**

ATENTAMENTE,

DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2020-05-21 16:04:23 | Firma:

kA6iDvCwFPjDaAaYSeoVAAg4+JDaJokJoa+XZ5vKVGWN92TCB4mam+7naP2Nbk+ZHLJ+nm2yUOhm9S/RahNH+7paZdnO7sa1H6S3gvN8ayPBolTGPrm0e0QYkbaCa8c1477
RCoZaL46qevZJBTcNULTV2j9CJokDaT046ixCbCvGQTWAAPrnMUTedcUPKVMR8Tqr1jSjuxRov9e+K9MTYv46uW49Coc2qPnBINLpuYLNNT1U9GRA00ba4OCEA6F3a8b
sYwYacAa2M3BR16Vc+DvNzWOUNUvRjW9vLbQR5bPrnH2Y2+usM4TYZKz6AGp8jS2H8Yw4A**

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



uDCPb@p#70a

<http://efirma.uaem.mx/noRepudio/NESoDicoLzPj90HNaIhYDhUYdWk7JPC>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Inene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL

Alumno que lo presenta a revisión: IRAN TAPIA VAZQUEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es APROBADO

ATENTAMENTE,

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2020-05-23 14:13:58 | Firmante

0NATnpY3eicPj6U1heUX4018oLH8KY8gnHMggcp8Iqzu8uOle859puaa8BPVSLK08hGiqUD8ku2/vp04R5d1ew4h9T0dZuX08RV44C3nyUZ+7ocW83qLZ0e4WTpU0x8Gul8-iGH7
8KfFgRNDInpJELeP8-P88T8PM64q8e8e8LM800R312132CLa8i8R4dN8Z3YDBP8e8ZR+eTN8e8GugP8e8M8C8e8e8P8I8H8B8e8Mu8KH8C8T8e8B8q8A8T8E8Q8U8e8O8T8e8Y8T8p8P8W8N
48TT8e8F8h8q8T8z8G8e8t8O8U8j8t8C8A8778q8g888K8g8C8e8C8u8e8P8j88V8V8i8C8e88p8W8e8O8g8M8L8g8e8

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[AnKpGRLMIKY](#)



<https://efirma.uaem.mx/ho/Repudio8V8bM85q8JN8JFL8Fq8Cr828RL8u868J>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

**Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL**

Alumno que lo presenta a revisión: IRAN TAPIA VAZQUEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

**El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO**

ATENTAMENTE,

DRA. VERÓNICA LIRA RUAN



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2020-05-22 10:24:33 | Firmante

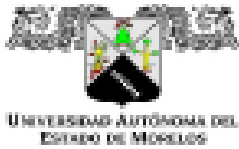
zp8AEVge815K3z2BP4oOodn9Q07gg+4UfchsD3QJRk2wouF50mHgJUN3VDTbb545MP+BV+0YQanT2gi7VstAhmp+AR4cD6E2Rqui0G3u+5v8Mka5+JFR0nYmasRvE8Q+D6T5dMgmNkMP1a1BV7xyevPyV4WT41AEJekvphg062yQ5nbV+ZCuQ8FYQZTZD1+dThn7xczW1u9hEDdUthoRkYaNURvZnN2qacjDkust06Z1Y1LpKqjG SourDN29C00d m3CEPmb6oW0CeW0GepEwUX+K5LDunVWQ7R17xDMNOVg1PW0aa.0GSpqVbaszuZw**

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



1D69OT7mh%LA

<http://firma.uaem.mx/noRepudio/ODpvyPoQ2i7ixXoOmCKWB4Z3azpsACAg>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL

Alumno que lo presenta a revisión: **IRAN TAPIA VAZQUEZ**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE,

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2020-05-21 14:51:23 | Firmante

RgN0QcprULZ7LoLjMagpoHog5mW5R6kAeU6W1Hkmy46N+GIFqY20K3EpLqCMMe52Qy6CObFLN0y7K3u8wyPbX00Q+HjALZ1Hd0maN0ny0X0+XgNguMqDkUWoRaMVer
N1K7DYvX8gysIHGnAIQoorWocjre04Na0y03YzP066LUACPr0La0ZNSNMfY0w03A5bk90MqN9005eL+eTzLn+IEVlakSaNYYPvBvXUekYETIKKkYUW0zaQaEOrjv7E.v6U
HVxRU0T5Ug6WLEAXLUNQhMihqUeImQNh0Mg0lqKHEXLHaP3vIptN03G6eLX7kaPj6A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



J41XU5Vcl3o

<http://efirma.uaem.mx/noRepudic/qUk03be0jv7J02m9ANN4GoCub.jkk>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

**Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL**

Alumno que lo presenta a revisión: IRAN TAPIA VAZQUEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

**El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO**

ATENTAMENTE,

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMBRES TRUJILLO | Fecha:2020-05-21 18:26:03 | Firmante

WwZy40bAldGPIUig6E.YN0pUgCbRAdoyVOZ9T8vIvewKpa+905YjEMtaModRn2OCjIm555w69E.eQ210cKk+YU3b1TtLht1NjM4T40bka7HMeOLJAs0CC.Dun6AWG1nht5e
 FvcY2DY1q9c3DbRa0wgnM89yok8baP1PV5aD6v4aLhc3ZLL7M4OLEUPFRgIFUJLD55E5E4hXmqj8R2PQR3/SmQa40XyashP7tpd8C.Uar8huY1QrgT2H93qu6Lh9ZRE5V
 A760+KG5YVWJew4vE5.AmkuuCl1naZ3G+2577L3m7haCh9HUfj3n5jRTBTmUg**

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



@7p2a6n4M2C

<http://firma.uaem.mx/nc/Repudio/vgrn2bxJot460JCGaY1UkM7H-Mb5Nk>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS**



**DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES
DES DE CIENCIAS NATURALES**

Cuernavaca, Morelos a 20 de mayo de 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (Tutor)
Dr. Ramón Alberto Batista García (Co tutor)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Dra. Verónica Lira Ruan
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Tesis: PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS Y PSICROTOLERANTES PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADOS DEL VOLCÁN XINANTÉCATL

Alumno que lo presenta a revisión: IRAN TAPIA VAZQUEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es APROBADO

ATENTAMENTE,

DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2020-05-28 12:47:52 | Firmante

REGMCEP6uTkmMDVW8Pvy00DkKz8NGom250TazWC0KQrHDY0gZMDCWwCaU5P7n5uJRWJhMOCkdx+Wa0fhaYMIcabeT02WPRMntA5uIDWn6a7xAC5gNHoo+NqN
mTMs3ua7S8RUSZzLXKODCaCG0g+dQ5Rvp5D9khdjR1+og8vmfCHZunLapRtUjC89ozteURabN0UBOQRWoinH8eCg4+MOQjDHS70zKQgT4jn8WMYQgJ34m7OHoC
6URhQASjUeNwNkPOUS5FMmYceBT0gLTZ0X0jFKAJ6Dnk5uk0gX03RFUUCmw1XRReMGQOMGw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



clHOQZj0R2

<http://efirma.uaem.mx/noRepudio/b2FRo5VpeTh6gu9VemJLxMkLdrHMV>