

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



SELECCIÓN E INOCULACIÓN DE HONGOS NATIVOS SOLUBILIZADORES
DE FÓSFORO DEL ESTADO DE COAHUILA, EN JITOMATE BAJO
DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN ORGÁNICA

Tesis

Que presenta ABRAHAM DE JESÚS ROMERO FERNÁNDEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

SALTILLO, COAHUILA

JULIO 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



SELECCIÓN E INOCULACIÓN DE HONGOS NATIVOS SOLUBILIZADORES
DE FÓSFORO DEL ESTADO DE COAHUILA, EN JITOMATE BAJO
DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN ORGÁNICA

Tesis

Que presenta ABRAHAM DE JESÚS ROMERO FERNÁNDEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Nombre del Director Interno

Dra. Rosa María Arias Mota
Nombre del Director Externo

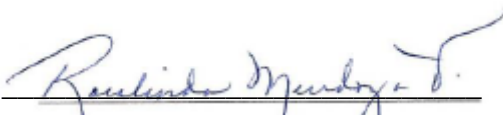
SALTILLO, COAHUILA

JULIO, 2018

SELECCIÓN E INOCULACIÓN DE HONGOS NATIVOS SOLUBILIZADORES
DE FÓSFORO DEL ESTADO DE COAHUILA, EN JITOMATE BAJO
DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN ORGÁNICA

Tesis

Elaborada por ABRAHAM DE JESÚS ROMERO FERNÁNDEZ como requisito
parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor Principal Interno



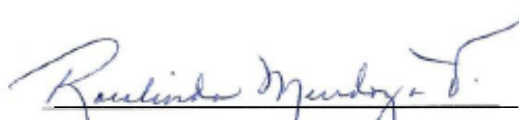
Dra. Rosa María Arias Mota
Asesor Principal Externo



Dr. Valentín Robledo Torres
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Postgrado
UAAAN

SALTILLO, COAHUILA

JULIO 2018

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Rosa Marías Arias Mota** quien nuevamente volvió a confiar en mí y me está viendo crecer de forma profesional y personal, las gracias se quedan cortas por todo su tiempo invertido y la amistad que hemos formado.

A la **Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal** por su tiempo, asesoría y amistad durante mi proceso de formación, nunca olvidaré sus palabras al inicio del proyecto “vienes de lejos y quiero que te lleves una bonita experiencia de nosotros”.

Al **Dr. Valentín Robledo Torres** por su asesoría y apoyo durante la realización del proyecto.

Al **Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente** por el apoyo en la realización de este proyecto.

A la **Dra. Gabriela Heredia Abarca** por seguir presente en mi formación profesional y el apoyo brindado al prestarme las instalaciones de su laboratorio.

A la **Dra. Marcela Franco Correa** por aceptarme en su Institución de trabajo la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, Colombia sin conocerme me trato como amigos de años, la experiencia y los buenos recuerdos no se olvidan.

A la M. en C. **Yamel Del Carmen Perea Rojas** por seguir presente en mi formación profesional, el apoyo en la medición en la parte cualitativa.

A la **Ing. Agrónomo Noemí Orozco Domínguez** por y el apoyo en la realización en el análisis de las muestras.

A la M en C. **Gloria Elisa Vallejo Maldonado** por el apoyo brindado en mi estancia en Saltillo, gracias por la confianza y la amistad.

A las Biólogas **Mayra y Miriam Lagunés** por el apoyo en los lavados de partículas y el aislamiento de los hongos.

A mi familia mis tíos **Teodora, Tere, Vero y Hugo** por su apoyo personal y económico que me brindaron en mi proceso de maestría.

A mis compañeros de la Maestría los **Ingenieros Eliseo, Francely, Rafael, Yolanda, Daniela e Israel** por su amistad y apoyo durante la estancia en la maestría.

A la **Técnico laboratorista Martina de la Cruz Casillas** por el apoyo en la realización en la parte del invernadero y su atención.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por abrirme las puertas para emprender una trayectoria de conocimientos para superarme de forma profesional y personal.

Al **Departamento de Horticultura** por la aceptación en la Maestría en Ciencias en Horticultura, me han dado la dicha de obtener una maestría de vida y de conocimientos personales y profesionales.

A mis amigos colombianos los **Microbiólogos Industriales María Chacón, Daniela Corchuelo, Diego Salazar y Santiago Gonzales** por brindarme su amistad y empaparme de sus conocimientos en mi estancia en su Universidad.

A mis primos **Verónica, Carlos, Miguel, Luis, Liliana, David, Marisol, Claudia y Pepe** por ser parte de mi día a día, sus vibras y su energía son indispensables para tener un buen desempeño en la realización de este trabajo.

A mis amigos de vida **Fermín, Luis Felipe, Marite, Jaqui, Carlos Alberto, Palmira, Yang, Anita, Itzel y Aline** por siempre creer en mí y ser fuente de apoyo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico proporcionado a través de la beca nacional en postgrados de calidad nivel maestría y en la beca mixta para estancias cortas, pieza clave para el desarrollo del presente trabajo.

Al **Laboratorio de Micromicetos Saprobios del Instituto de Ecología A.C.**, por el apoyo con las instalaciones para realizar la investigación de este proyecto.

Al **Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Análisis Minerales** de la UAAAN, por el apoyo con las instalaciones para realizar la investigación de este proyecto.

A la M. en C. **Sandra Rocha Ortiz** por el apoyo en los análisis de suelo y la amabilidad al consultar cualquier duda.

A la M. en C. **Karla Tapia Fierro** y. A la C. **Ninfa Portilla Loeza** por el apoyo en los análisis de las muestras de suelo.

DEDICATORIA

A mi mamá, por su apoyo, por apostar nuevamente en mí y ser el golpe que siempre ocupo cuando pienso que ya no hay más, este logro es nuestro, me das siempre los mejores regalos de vida, te amo.

A mi abuelita, porque sé que gracias a tus oraciones estoy donde debo de estar, por favor nunca me faltes.

“No tengo ningún talento especial. Sólo soy apasionadamente curioso.”

Albert Einstein

Índice General

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Objetivo general..... | 3 |
| Objetivos Específicos..... | 3 |
| Hipótesis..... | 3 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) | 4 |
| El fósforo (P) en el suelo | 6 |
| Mecanismos de transformación del fósforo | 7 |
| Fertilizantes orgánicos fosfatados..... | 9 |
| Biofertilizantes..... | 13 |
| Hongos Solubilizadores de Fósforo (HSF) | 14 |
| Inoculaciones de HSF en cultivos..... | 15 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| Localización de los sitios de muestreo..... | 16 |
| Colecta de muestras de suelo..... | 16 |
| Aislamiento y selección de los hongos solubilizadores de fósforo | 17 |
| Evaluación cualitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos..... | 18 |
| Evaluación cuantitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos seleccionadas | 18 |
| Evaluación del efecto de la inoculación de las cepas de hongos solubilizadores de fósforo seleccionadas y diferentes dosis de fertilizantes sobre la disponibilidad de P y el crecimiento de las plantas de jitomate..... | 19 |
| Preparación del inóculo de los hongos solubilizadores de fósforo (HSF) | 19 |
| Desinfección de las semillas de jitomate..... | 19 |
| Inoculación de los hongos solubilizadores de fósforo a las plantas de jitomate | 19 |
| Diseño experimental | 20 |
| Medición de fósforo disponible del sustrato de las plantas de jitomate..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| Medición del fósforo total de la raíz y de la parte aérea de las plantas | 21 |
| Medición de variables agronómicas..... | 22 |
| Análisis estadísticos | 22 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 23 |
| Aislamiento y selección de hongos fosfato solubilizadores de suelos del estado de Coahuila..... | 23 |
| Evaluación cualitativa de eficiencia de solubilización de los hongos | 24 |
| Evaluación cuantitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos seleccionadas | 26 |
| Evaluación del efecto de la inoculación de las cepas de hongos solubilizadores de fósforo seleccionadas y diferentes dosis de fertilizantes orgánicos sobre la disponibilidad de P y el crecimiento de las plantas de jitomate. | 31 |
| Fósforo disponible en el sustrato | 31 |
| Fósforo total en la parte aérea..... | 32 |
| Variables agronómicas de las plantas de jitomate | 35 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| REFERENCIAS | 42 |
| Anexos | 55 |
| Anexo 1. Elaboración del medio de Sundara (Sundara y Sinha, 1923) | 55 |
| Anexo 2. Determinación de fósforo soluble con el método de reducción del ácido ascórbico..... | 56 |
| Anexo 3. Elaboración de la solución nutritiva de Hewitt (1969) | 58 |
| Anexo 4. Determinación del fósforo soluble en el sustrato: Método Bray y Kurtz, (1945) | 59 |
| Anexo 5. Cuantificación del fósforo total de la parte aérea | 61 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Clasificación de los países productores a nivel mundial..... | 4 |
| Figura 2. Localización de los sitios de estudio | 16 |
| Figura 3. Halos de solubilización de algunas cepas | 24 |
| Figura 4. Concentración de P soluble y pH del medio líquido | 29 |
| Figura 5. Relación entre el P soluble y el pH del medio líquido | 30 |
| Figura 6. A) Fósforo disponible en el sustrato de las plantas de jitomate, B) Fósforo total en la parte aérea de las plantas de jitomate | 34 |
| Figura 7. A) Número de flores, B) Número de racimos y C) Diámetro del tallo de las plantas de jitomate | 38 |
| Figura 8. A) Altura, B) Longitud de raíz y C) Tasa de crecimiento de las plantas de jitomate..... | 39 |
| Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación del fósforo total de la parte aérea.. | 62 |

Lista de cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Productos fosforados | 11 |
| Cuadro 2. Clasificación de los fosfatos en un fertilizante | 12 |
| Cuadro 3. Datos de los análisis del suelo | 17 |
| Cuadro 4. Tratamientos evaluados en el invernadero..... | 20 |
| Cuadro 5. Índice de Eficiencia de solubilización | 27 |
| Cuadro 6. Análisis de correlación entre las variables evaluadas | 40 |
| Cuadro 7. Métodos de preparación de los reactivos con el método de reducción de ácido ascórbico | 55 |
| Cuadro 8. Descripción de las diferentes concentraciones de fósforo, en la curva de calibración..... | 58 |

RESUMEN

SELECCIÓN E INOCULACIÓN DE HONGOS NATIVOS SOLUBILIZADORES DE
FÓSFORO DEL ESTADO DE COAHUILA, EN JITOMATE BAJO DIFERENTES
DOSIS DE FERTILIZACIÓN ÓRGANICA

POR

ABRAHAM DE JESÚS ROMERO FERNÁNDEZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL -ASESOR-

SALTILLO, COAHUILA

JULIO 2018

El objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar hongos nativos fosfato solubilizadores en Coahuila con potencial para ser utilizados como biofertilizantes. El aislamiento de los hongos se realizó por lavado de partículas y la capacidad fosfato solubilizadora por la presencia de halos en medio con fosfato tricálcico y el índice de eficiencia de solubilización. La evaluación cuantitativa se realizó a través de la cuantificación del P soluble por el método de ácido ascórbico. Las plantas de jitomate se inocularon con las tres mejores cepas con diferentes dosis de roca fosfórica; después de 4 meses en invernadero, se evaluó el P disponible en el sustrato, P foliar y las variables agronómicas. En total, se aislaron 271 cepas de hongos; el 52.6% proyectaron resultados positivos a la solubilización. Las cepas *Sp.Mz54*, *Aspergillus* sp.4C19, *Penicillium* sp.Mu73, *Penicillium* sp. Mu77 y *Penicillium* sp.A56 presentaron los mayores índices de eficiencia de solubilización. En la medición cuantitativa, la cepa *Penicillium* sp.Mu73 solubilizó la mayor cantidad de fósforo. En el ensayo en el invernadero, las cepas *Aspergillus* sp.Mu42 con 25% de roca fosfórica y *Penicillium* sp.A56 con 50% de roca fosfórica propiciaron una mayor disponibilidad de P foliar en las plantas, favoreciendo a las variables agronómica. Mediante este trabajo se propone el uso de estos hongos solubilizadores nativos como una alternativa para la aplicación de los biofertilizantes en conjunto con la roca fosfórica, adoptando de esta manera una estrategia que considere la reducción en los costos de producción, la conservación y recuperación de los suelos.

Palabras clave: biofertilizantes, hongos filamentosos, fosfato tricálcico, roca fosfórica.

ABSTRACT

SELECTION AND INOCULATION OF NATIVE FUNGI SOLUBILIZERS OF
PHOSPHORUS IN THE STATE OF COAHUILA, IN TOMATO UNDER
DIFFERENT DOSES OF ORGANIC FERTILIZATION

BY

ABRAHAM DE JESÚS ROMERO FERNÁNDEZ

MASTER OF SCIENCE IN HORTICULTURE
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL -ADVISOR-

SALTILLO, COAHUILA

JULIO 2018

The objective of the present study was to isolate and select native phosphate-solubilizing soil fungi from Coahuila state with potential to be used as biofertilizers. Fungal strains were isolated using the soil-particle washing technique. The selection of phosphate-solubilizing strains was performed in a Sundara medium with tricalcium phosphate and the solubilizing phosphate capacity was detected by the presence of hyaline halos and was carried out by calculating the solubilization index. In the quantitative evaluation, the cultures were incubated for 25 days and every five days, soluble P by the ascorbic acid method. The tomato plants were inoculated with the three best strains fungi with phosphate rock in different doses; after 4 months in the greenhouse, the available P in the substrate, leaf P and the agronomic variables were evaluated. A total of 271 strains of fungi were isolated. Of these isolates, 52.6% tested positive for phosphate solubilization. The strains Sp.Mz54, *Aspergillus* sp.4C19, *Penicillium* sp.Mu73, *Penicillium* sp.Mu77, and *Penicillium* sp.A56 presented the highest solubilization efficiency indices. In the quantitative evaluation, the strain *Penicillium* sp. Mu73 solubilized the most phosphorus. In the greenhouse experiment, strains *Aspergillus* sp.Mu42 with 25% phosphate rock and *Penicillium* sp.A56 with 50% phosphate rock showed higher availability of foliar P in plants, favoring agronomic variables. This work proposes the use of these native solubilizing fungi as an alternative for the application of biofertilizers with phosphate rock, thus adopting a strategy that considers the reduction in production costs, conservation and recovery of soils.

Key words: biofertilizers, filamentous fungi, tricalcium phosphate, phosphate rock.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del jitomate en México es de los más importantes, ya que es el principal proveedor a nivel mundial de este cultivo, con una participación en el mercado internacional de 25.11 % del valor de las exportaciones mundiales. En el mercado internacional, durante el 2017 el jitomate mexicano cubrió 90.67% de las importaciones de Estados Unidos y 65.31% de Canadá (SAGARPA, 2017). Los cultivos hortícolas, demandan grandes cantidades de fertilizantes para expresar su máximo rendimiento y calidad. El fósforo (P) es uno de los nutrientes más importantes que determinan el rendimiento y la calidad de la producción en las plantas (Noh-Medina *et al.*, 2010; Reta *et al.*, 2007).

En el suelo, el P se encuentra en muy bajas concentraciones (5-30 mg Kg⁻¹) debido a que la parte soluble del P forma enlaces con iones como el calcio, hierro o el aluminio lo que provoca su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas (Tapia y García, 2013). La deficiencia de este nutriente generalmente es atendida mediante la aplicación de fertilizantes sintéticos, sin embargo, éstos al ser aplicados en dosis superiores a lo requerido por el cultivo, conducen a riesgos de contaminación ambiental, por la lixiviación del fertilizante no absorbido hacia aguas subterráneas, además su aplicación excesiva conlleva a la degradación de la calidad de los suelos por salinidad y un incremento infructuoso en los costos de producción (Cardenas *et al.*, 2004).

Bajo este contexto se han desarrollado diversas alternativas para contrarrestar esta situación, tales como la agricultura orgánica y la agroecología, procesos que implican una transformación en la conciencia sobre la agricultura, logrando como principal resultado la sustitución de insumos químicos por biológicos o productos de origen natural como la roca fosfórica (RP) (Funes, 2001).

La aplicación directa de RP en la agricultura puede ser ecológicamente viable cuando se combina con microorganismos benéficos, dada su capacidad de promover la solubilización y absorción del P hacia la planta (Velázquez *et al.*, 2017). La RP constituyen un recurso de interés como fuente natural de P para la agricultura (Raigemborn *et al.*, 2010; Smith y Read, 2008). Si bien la RP presenta bajos contenidos de P, logra ser una alternativa económica y ecológica cuando se realizan aplicaciones directas de RP solas o en conjunto con microorganismos capaces de solubilizar el P, tales como los

hongos solubilizadores de fosfato (HSF) (Gyaneshwar, 2002).

El aumento de la concientización sobre el cuidado del ambiente ha hecho que los productores agrícolas, vean como una alternativa la aplicación de los biofertilizantes en conjunto con RP, adoptando nuevas estrategias que van en aumento tanto en la agricultura orgánica como en la convencional (Armenta *et al.*, 2010).

Dichas aplicaciones, permiten una reducción en los costos de producción (hasta un 20 %), la conservación y recuperación de los suelos, así como de la biodiversidad (Fernández y Rodríguez, 2015). Numerosos estudios han demostrado una respuesta positiva de las plantas a la aplicación de RP en conjunto con hongos solubilizadores de fósforo en cultivos como jitomate (Sibi, 2011), pepino (García López *et al.*, 2015), chicharo (Ramírez *et al.*, 2013), arroz (Borges Chagas *et al.*, 2015), frijol (Elías *et al.*, 2016), Avena (Lima- Rivera *et al.*, 2016), café (Cisneros y Menjivar, 2016) y sorgo (Steiner *et al.*, 2016). Una característica de estos microorganismos del suelo es que tienen la capacidad de relacionarse entre sí, dando lugar a interacciones sinérgicas que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Fernández y Rodríguez, 2015). Los organismos solubilizadores tienen la habilidad de transformar el fosfato orgánico e inorgánico, al romper los enlaces que forma el fósforo con los iones metálicos (Fe, Ca y Al) y así transformarlo en soluble (Restrepo *et al.*, 2015). Además, se ha observado que la utilización de cepas nativas de hongos en la elaboración del inoculante biológico, presentan mayores posibilidades de efectividad en el campo, por estar adaptados a las condiciones del suelo de cada región (Armenta *et al.*, 2010).

Así, el uso de bioinoculantes constituye una alternativa ecológicamente aceptable para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad, además pueden ser generados a partir de recursos locales y tener carácter endógeno. En este estudio se pretende aislar cepas nativas de hongos solubilizadores de fósforo de suelos del estado de Coahuila y evaluar el efecto de la inoculación de estos microorganismos sobre el desarrollo de plantas de jitomate bajo diferentes dosis de fertilización orgánica en condiciones de invernadero.

Objetivo general

Seleccionar cepas nativas de hongos solubilizadores de fósforo y evaluar su efecto sobre la disponibilidad de fósforo y el desarrollo de las plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo diferentes dosis de fertilización orgánica en condiciones de invernadero.

Objetivos Específicos

1. Aislar y seleccionar cepas de hongos con capacidad fosfato solubilizadora de suelos del estado de Coahuila.
2. Evaluar cualitativamente la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos aisladas.
3. Evaluar cuantitativamente la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas seleccionadas.
4. Evaluar el efecto de la inoculación de tres cepas de hongos solubilizadores de fósforo y cuatro dosis de fertilización orgánica sobre la disponibilidad de P y el desarrollo de las plantas de jitomate.

Hipótesis

La inoculación de hongos nativos solubilizadores de fósforo con la roca fosfórica en jitomate favorecerá la disponibilidad de fósforo, lo cual se verá reflejado en un mayor desarrollo y productividad de las plantas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

El jitomate es un producto agrícola con una gran importancia económica a nivel mundial (FAOSTAT, 2011). Es una planta que pertenece a la familia de las Solanáceas, género *Lycopersicon*, del cual se derivan un gran número de especies, variedades e híbridos. El jitomate es originario de la región Sur Central de Perú, gracias a su capacidad de adaptación se cultiva tanto en ambientes secos como húmedos. Evidencias etnobotánicas sugieren que su domesticación se desarrolló en México, distribuyéndose a Europa después de la conquista española (Rodríguez *et al.*, 2001).

El jitomate es una de las hortalizas básicas de mayor valor y producción a nivel mundial, se estima una producción de 170 millones de kilos con valor de 100.000 millones de euros (FAO, 2017). Los principales países productores son: China (31 %), India (11 %) y Estados Unidos (8 %) respectivamente, en el mismo año México se ubica en décimo lugar (4.7 %) (SIAP, 2015) (Figura 1). Dentro de la producción nacional, Sinaloa es el estado con mayor producción (36.6 %), seguido de Baja California (6.7 %) y Michoacán (4.0 %) (SIAP, 2015). Las principales variedades de jitomate producidas en nuestro país son: bola, saladette, cherry y rio Grande. De acuerdo a SIAP, (2015), la variedad saladette ocupa el primer lugar en producción y valor económico.

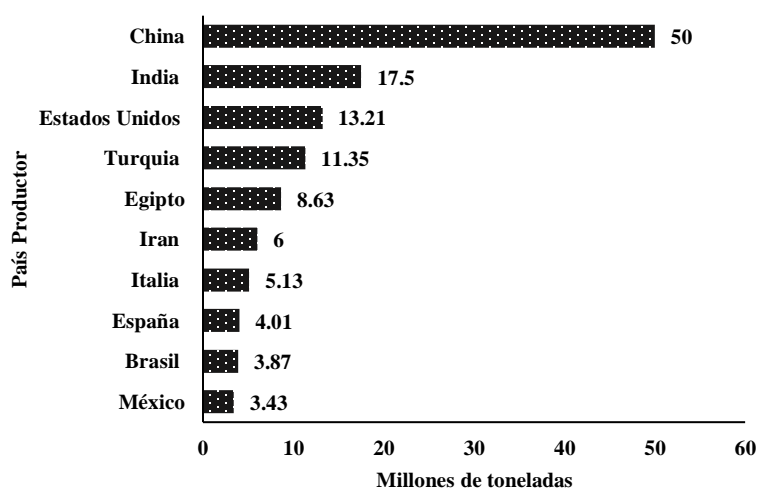


Figura 1. Clasificación de los países productores de jitomate a nivel mundial (en millones de toneladas) (SIAP, 2015).

El cultivo de jitomate genera importantes divisas para el país, se reportan 39.5 ha⁻¹ en producción, aproximadamente un tercio de la producción nacional se exporta a Estados Unidos. En México, esta hortaliza se ubica en la posición número uno en productos de exportación agroalimentarios y representa una de las oportunidades de inversión más rentables y de mayor futuro, ya que es un producto que genera un alto valor económico y gran demanda de mano de obra debido a que genera 72,000 empleos directos y 10.7 millones de empleos indirectos. Una de las razones que explica que el jitomate sea el producto dentro de los que destacan más en hortalizas en invernadero es su alta cotización en los mercados internacionales, en la actualidad el comercio internacional se concentra principalmente en Estados Unidos (su demanda proviene de México y de Canadá) y los países de la Unión Europea (SIAP, 2015).

Los nutrientes en el jitomate juegan un papel muy importante en la productividad de las plantas y la calidad de los frutos. Este cultivo, necesita de 16 elementos en diferentes cantidades para expresar su máximo rendimiento y calidad de la producción en las plantas. El nitrógeno, fósforo y potasio se requieren en altas cantidades. Los fertilizantes de nitrógeno más comunes son urea, nitrato de amonio, nitrato de calcio y nitrato de potasio. Las fuentes de potasio son cloruro de potasio, sulfato de potasio y nitrato de potasio. Las fuentes de fósforo son menos y las más comunes son el fosfato monoamónico y fosfato diamónico. La elección del fertilizante depende del clima, forma del nutrimento, pureza, salinidad, solubilidad y el costo; en todos los casos es necesario el análisis fisicoquímico del suelo para la toma de decisiones (Tisdale *et al.*, 2004).

La producción comercial exitosa de cultivos hortícolas exige que el productor haga uso óptimo de los recursos disponibles. Uno de estos recursos de mayor importancia es la utilización de fertilizantes (orgánicos e inorgánicos) que brindan los elementos necesarios para un crecimiento y desarrollo óptimo para las plantas, logrando obtener un rendimiento satisfactorio y así obtener una buena cosecha para cumplir con los requerimientos que demanda el mercado internacional. Si los nutrientes están ausentes o en bajas concentraciones el rendimiento y la calidad de la hortaliza será pobre, en cambio cuando existen excesos el costo de producción aumenta, pudiendo ocasionar toxicidad en las plantas y la posibilidad de una lixiviación de los nutrientes (Reyes-Ocampo *et al.*, 2017).

El fósforo (P) en el suelo

El fósforo (P) es considerado como uno de elementos más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Smil, 2000). Este nutriente contribuye a la formación de biomasa, procesos metabólicos de transferencia de energía, transducción de señales, biosíntesis de macromoléculas, fotosíntesis y en reacciones de respiración en cadena. Además promueve la aceleración de la formación y crecimiento de las raíces, mejora la calidad de la fruta, hortalizas, granos y además es vital para la formación de semillas, ayuda a las raíces y a las plántulas a desarrollarse rápidamente y mejora su resistencia a las bajas temperaturas, incrementa la eficiencia del uso del agua, contribuye a la resistencia de algunas plantas a enfermedades y adelanta la madurez, es de suma importancia para obtener rendimientos más altos y calidad de los cultivos (Shenoy y Kalagudi, 2005).

Este elemento se encuentra en muy bajas concentraciones en el suelo ($5-30 \text{ mg Kg}^{-1}$), ya que forma enlaces iónicos con elementos (Ca^{+2} , Al^{+3} y Fe^{3+}) lo que ocasiona su fijación, disminuyendo su disponibilidad para ser absorbido por las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999). De igual forma el fósforo inorgánico aplicado como fertilizante tiende a ser inmovilizado en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados (Peix *et al.*, 2001). Este se puede agrupar en dos fracciones: fósforo inorgánico (Pi) y fósforo orgánico (Po), el primero se refiere al P de naturaleza mineral y el segundo al que se encuentra unido o acomplexado con la materia orgánica (Sharma *et al.*, 2013). El origen del Pi es la descomposición y desintegración de rocas y materiales parentales que contiene apatitas (Mackey y Paytan, 2009), sus formas están asociadas con sesquióxidos amorfos y cristalinos, además de porciones de compuestos calcáreos, esta fracción representa entre el 35- 70 % del P total del suelo (Shen *et al.*, 2011). Otro aporte de Pi es la transformación de la materia orgánica por diferentes microorganismos como bacterias y hongos a través de la mineralización del Po (Restrepo *et al.*, 2015). El Po se presenta en los suelos como ésteres de ácido ortofosfórico, fosfato de inositol, fosfolípidos, ácidos nucleicos y azúcares fosfatados (Sharma *et al.*, 2013). Antes de ser absorbido por las plantas, cierta cantidad de fósforo que es aplicado como ortofosfato tiende a transformarse rápidamente en formas poco solubles y para contrarrestar esta situación se aplican fertilizantes fosfatados (Khan *et al.*, 2010); no obstante, sus repetidas aplicaciones pueden conducir a una pérdida de la

fertilidad del suelo ocasionando perturbaciones en la diversidad microbiana y sus actividades metabólicas asociadas (Gyaneshwar *et al.*, 2002), lo que conlleva a una reducción en el rendimiento de los cultivos. Esto genera pérdidas en la rentabilidad y obliga la búsqueda de nuevas alternativas que mejoren la biodisponibilidad del P en los suelos a través del uso de materias primas menos costosas y ambientalmente amigables (Kaur y Reddy, 2014).

Mecanismos de transformación del fósforo

La transformación del P en los suelos implica complejos procesos mineralógicos, químicos y biológicos. El ciclo del P en el suelo es un sistema dinámico bajo la influencia de transformaciones químicas a largo plazo y cambios a corto plazo debido a la absorción por la planta. La lixiviación de bases, la eliminación de carbonatos y el incremento de la actividad Al^{+3} y Fe^{3+} que acompañan el desarrollo de los suelos provoca un cambio de formas Pi primarias a secundarias y también influyen en la estabilidad de la materia orgánica y su Po asociado (Walker y Syers, 1976).

El carbono orgánico del suelo tiene un papel importante de promoción de procesos relacionados en la transformación del P, a través de su contribución como fuente de energía para la actividad microbiana (Stevenson y Cole, 1999). Los microorganismos están fuertemente involucrados en la transformación de P de distintas maneras: 1) mediante la promoción de la solubilización de formas minerales fijas o insolubles de P, a través de la producción de agentes quelantes; 2) por la descomposición de compuestos de Po, con liberación de Pi disponible; y 3) por la inmovilización de P disponible en el material celular (Stevenson y Cole, 1999).

Mineralización

Es la conversión microbiana del P orgánico a $H_2PO_4^{-1}$ o HPO_4^{-2} (ortofosfato), las cuales son las formas del fósforo asimilables para las plantas, el fósforo P orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y Zamuner, 2002). Este proceso está mediado por las enzimas fosfatasas que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasas ácidas, los hongos

y las bacterias son capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas (Ridge y Rovira, 1971). Entre los compuestos orgánicos del fósforo que pueden estar presentes en el suelo están los ácidos nucleicos, la lecitina y la fitina los cuales en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación para los microorganismos pueden ser degradadas por acción de estas enzimas logrando liberar fósforo en forma de fosfatos (Alexander, 1987).

Solubilización

La solubilización hace referencia a la liberación de P inorgánico (forma no asimilable) a P inorgánico (asimilable) (Sharma *et al.*, 2013). Una de las vías principales de solubilización es mediante la producción de ácidos orgánicos tales como el ácido nítrico y el ácido sulfúrico (Sayer *et al.*, 1995)

La solubilización puede producirse mediante dos mecanismos: por la acción de los ácidos orgánicos producidos por microorganismos o por quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes (Sharma *et al.*, 2013). Un mecanismo indirecto para la solubilización ocurre cuando los microorganismos asimilan directamente los fosfatos insolubles acumulándolos en sus células y liberándolos posteriormente (Begonia *et al.*, 2004).

El mecanismo de solubilización en los suelos se ve favorecido cuando estos presentan pH bajos, con un bajo contenido de calcio y alto contenido de materia orgánica además va a depender también del contenido de fósforo presente en la solución del suelo (Begonia *et al.*, 2004).

Inmovilización

La inmovilización se presenta cuando el P queda atrapado dentro de los microorganismos, por lo tanto, deja de estar disponible para las plantas. Las concentraciones microbianas de fósforo son 10 veces más que las que se encuentran presentes en los vegetales. La mayor concentración de P presente en los microorganismos se va a localizar en el ARN con rangos superiores que van de los 30 al 50% respectivamente siendo un proceso vital para los microorganismos pues es la forma en como integran el P a sus células, constituyendo

los ácidos nucleicos, fosfolípidos y otras moléculas. Siendo el resultado principal de este proceso P orgánico no disponible (Oberson y Joner, 2005).

Oxido- Reducción

Esta reacción también se lleva a cabo dentro de los microorganismos y consiste en la transformación por oxidación de los ésteres de P del suelo o fosfitos en fosfatos orgánicos. Este proceso es aprovechado por las plantas ya que logran asimilar el fósforo que se encuentra como reserva orgánica en el suelo denominado como “humus” (Bobadilla y Rincón, 2008)

Fertilizantes orgánicos fosfatados

Los fertilizantes fosfatados constituyen tecnologías de gran importancia en agroecosistemas y el conocimiento de sus propiedades resulta una herramienta importante para optimizar su manejo en los sistemas agrícolas (Gutiérrez Castorena *et al.*, 2015).

La roca fosfórica (RF) es una materia prima usada en la producción de todos los fertilizantes fosfatados (Sediyama *et al.*, 2000) en la agricultura logra ser ecológicamente viable debido su capacidad de promover la solubilización y absorción del P hacia la planta (Velázquez *et al.*, 2017). La RP constituyen un recurso de interés como fuente natural de P (Raigemborn *et al.*, 2010; Smith y Read, 2008). Los depósitos más importantes son materiales sedimentarios, depositados primero en capas ubicadas en el fondo de los océanos, pero con el paso del tiempo se fueron elevando junto con la masa de la tierra, las reservas conocidas de RF acumulan aproximadamente 40 billones de toneladas. Gracias a las condiciones actuales de tecnología, alrededor del 35 al 40 % de estas reservas han logrado ser recuperadas económicamente. Los depósitos y la producción más grande de RF se encuentran ubicadas en países como Estados Unidos, Marruecos, Togo, Rusia, Jordania, China y Australia, (León,1991).

En general la RF contiene alrededor de 10% de P, pero con el paso del tiempo estudios han demostrado que puede ser sometida a procesos de purificación que elevan el contenido de P (estos procesos de beneficio remueven arcillas y otras impurezas). Finalmente, el material se muele y es posible su aplicación directa al suelo. En algunos países se usa RF

como fertilizante en suelos ácidos, generalmente se aplican altas cantidades (aproximadamente 1 t/ha) obteniendo resultados iguales o superiores a aquellos obtenidos con fertilizantes sintéticos solubles. Los rendimientos se ven incrementados a medida que pasa el tiempo de la aplicación y se sigue así por varios años a medida que el P y el Ca se disuelven y se tornan disponibles para las plantas (Morillo y Ramírez, 2007).

Los fertilizantes fosfatados se pueden clasificar conforme a su manufactura en fertilizantes tratados en ácidos o en materiales procesados termalmente. El P tratado en ácido sin discusión es el más importante. Los ácidos sulfúricos (H_2SO_4) y fosfóricos (H_3PO_4) son usados para elaborar fertilizantes fosfatados. Al tratar la RF con ácido sulfúrico concentrado (90 a 93%) se produce una mezcla de ácido fosfórico y yeso. Un proceso de filtración remueve el yeso presente dejando únicamente ácido fosfórico denominado verde de proceso húmedo o de grado comercial (que contiene aproximadamente 54% de P_2O_5) (Bonomelli *et al.*, 2003).

El ácido de grado comercial se logra concentrar para la formación de ácido superfósforico. El ácido superfósforico (ASF) es fabricado mediante la evaporización del agua del ácido fosfórico de proceso húmedo. En este proceso se combinan dos o más moléculas de ortofosfato para formar polifosfatos. Las polifosfatos se usan más en la fabricación de fertilizantes líquidos transparentes (con un contenido de 68 a 80%) de P_2O_5 . El proceso de acidulación de la RF con ácido sulfúrico es la técnica más común para solubilizar el P de la roca (León, 1991).

A continuación, se describen algunos de los fertilizantes fosfatados más comunes utilizados con fines agrícolas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Productos fosforados

| Fertilizante | Descripción |
|--|--|
| Superfosfato normal o simple (SFS) | Es fabricado tratando RF con una cantidad conocida de ácido sulfúrico (concentración de 60 a 72%). El superfosfato simple contiene aproximadamente 20% de P_2O_5 y 12% de S. Actualmente no se usa de manera masiva a pesar de que es una buena fuente de P y de S. Debido a que tiene la capacidad de absorber amonio, se utiliza para elaborar superfosfatos amoniacales. |
| Superfosfato concentrado (SFC) o Superfosfato triple (SFT) | Es obtenido de la reacción del ácido fosfórico de proceso húmedo con RF. Contiene aproximadamente 46% de P_2O_5 . |
| Ortofosfato de amonio | Son elaborados a base de amoniación del ácido fosfórico. El fosfato monoamónico (MAP: 10 a 12% de N y 50 a 55 de P_2O_5) y el fosfato diamónico (DAP: 18-46-0) son fabricados controlando la cantidad de amonio que reacciona con el ácido fosfórico. |
| Polifosfatos de amonio | Son una fuente líquida de P, hechas a base de amoniación del ácido superfosfórico logrando contenidos de polifosfato de 40 a 70%. La mayoría de los fertilizantes líquidos a base de polifosfatos tienen fórmulas de 10-34-0 y 11-37-0. |
| Fosfatos nítricos | Son elaborados mediante la acidulación de RF con ácido nítrico. Para lograr hacer el material más soluble en agua se utilizan ácido sulfúrico o fosfórico junto con el ácido nítrico. Siendo los países europeos los de mayor producción y consumo de este tipo de fertilizante fosfatado. |
| Superfosfatos amoniados | Son fabricados mediante la reacción de superfosfato simple o superfosfato triple con amonio. Podemos encontrarlos en diferentes fórmulas y grados de solubilidad en agua. La cantidad de P soluble en agua de estos fertilizantes está influenciada por la fuente de fosfato, grado de amoniación, contenido de impurezas (otras sales), contenido de humedad y velocidad de secado. |

Fuente: Villarreal y Alfaro, (1997).

En general es mejor usar fuentes de P solubles en agua, pero se ha observado que, en suelos ácidos de los trópicos, la aplicación de RF altamente reactiva logra ser una excelente fuente de P para la mayoría de los cultivos (Sediyama *et al.*, 2000). Con la utilización de RF es indispensable saber que se obtienen mejores resultados cuando se trabaja en suelos con pH ácido (<5.5) y aplicando una roca muy reactiva (la reactividad de la roca depende mucho de la estructura del cristal), las rocas ígneas no reaccionan aun en suelos ácidos, mientras que las llamadas rocas metamórficas tienen una mayor actividad cuando el suelo presenta un pH ácido, por lo tanto si no se satisfacen las

condiciones ya mencionadas (suelo ácido y roca altamente reactiva) la respuesta a la aplicación de RF directa en campo será muy baja. Así que la aplicación de RF en suelos tropicales ácidos puede tener un impacto adverso muy significativo (Romero *et al.*, 2003). La capacidad de solubilización en agua del P presente en los fertilizantes fosfatados no siempre indica que tan disponible está el P. Sin embargo, existen métodos químicos que pueden facilitar la determinación del contenido total del P, cuanto es soluble en agua y cuando se encuentra de manera disponible (Villarreal y Alfaro, 1997). De igual forma existe una clasificación de los fosfatos presentes en un fertilizante, los cuales se clasifican de la siguiente forma (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de los fosfatos presentes en los fertilizantes

| Clasificación del fosfato | Descripción |
|------------------------------|---|
| Fósforo soluble en agua | Se logra extraer del fertilizante utilizando solo agua. |
| Fósforo soluble en citrato | Es extraído con una solución 1 normal de citrato de amonio neutro (esto se realiza después de haber removido el P soluble). |
| Fósforo disponible | Es la suma total de las fracciones solubles en agua y en citrato. |
| Fósforo insoluble en citrato | Se dice que es la porción residual posterior a la extracción con agua y citrato. |
| Fósforo total | Es la suma total de P disponible y P insoluble en citrato |

Fuente: Villarreal y Alfaro, (1997).

Todos los nutrientes esenciales requeridos para la producción en la agricultura tienen una relación con la calidad del ambiente. Generalmente ellos hacen una mejora en el potencial de producción y en la integridad ambiental de las parcelas cuando se utilizan cantidades adecuadas y de forma balanceada. Los nutrientes tienen un papel muy importante ya que promueven cultivos más vigorosos y productivos, logrando desarrollar sistemas radiculares más grandes, abundantes residuos sobre la superficie, cobertura rápida del suelo, eficiencia del uso del agua y mayor resistencia (ante estrés producida por sequía, insectos, bajas temperaturas) (Reyes-Ocampo *et al.*, 2017).

Aun cuando los nutrientes esenciales desempeñan un papel vital en la agricultura, algunos de ellos presentan riesgos ambientales cuando no se manejan adecuadamente. Por lo general el P ha sido asociado con problemas ambientales principalmente a través de la eutrofización de lagos y cuerpos de agua sin movimiento, generando un desequilibrio en

los ecosistemas, lo cual afecta a sus poblaciones nativas (Nebel y Writght, 1996). Otra de las desventajas de la fertilización química del P y haciéndola poco efectiva es su rápida conversión de P soluble a insoluble (Moratto *et al.*, 2005), provocando un bajo aprovechamiento por parte de las plantas en la adquisición de fósforo y elevando los costos de producción (Clesceri *et al.*, 1992). Esta situación hace que sea necesaria la creación de variedades vegetales altamente eficientes en su adquisición y uso de nutrientes o la implementación de estrategias sostenibles de fertilización (Lambers *et al.*, 2006).

Biofertilizantes

Como se sabe, las interacciones microbianas con las raíces tienen un efecto profundo en el estatus nutricional de las plantas (Kücük *et al.*, 2008); basados en este principio se han desarrollado insumos biológicos, denominados biofertilizantes, que son reconocidos como enmiendas microbianas producidas a partir de microorganismos que por lo general se encuentra en el suelo y que gracias a su actividad biológica logran poner a disposición de las plantas una parte importante de sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo (Beltrán, 2014). Se ha determinado que la aplicación de biofertilizantes no perjudica la calidad de los suelos, contribuye a prácticas de fertilización más rentables y seguras para el medio ambiente (Fankem *et al.*, 2006)

Dentro de los microorganismos que pueden funcionar como base para la formulación de dichos insumos se incluyen microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPRs en sus siglas en inglés) (Richardson *et al.*, 2009). Los microorganismos considerados PGPR (en sus sigla en inglés) ayudan a solubilizar fósforo y otros nutrientes (Souchie *et al.*, 2005) aumentan la resistencia de las plantas ante el estrés tales como bajas temperaturas (Chares *et al.*, 1993), sequía (Ruiz- Lozano *et al.*, 1995) y salinidad (Cantrell y Linderman, 2001), ayuda a estabilizar los agregados del suelo mejorando su estructura y el contenido de materia orgánica (Puente *et al.*, 2010), aumentos en los rendimientos y calidad de las cosechas (Moreno *et al.*, 2007), obtención de nutrientes de baja movilidad tales como zinc, fósforo y cobre (Cantrell y Linderman, 2001), producción de sideróforos (Puente *et al.*, 2010) además también secretan sustancias al medio como metabolitos secundarios conocidos como fitohormonas las cuales son estimulantes para el desarrollo vegetal (De-Bashan *et al.*, 2012).

Hongos Solubilizadores de Fósforo (HSF)

Los hongos solubilizadores de fósforo, son parte de un gran grupo conocido como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM). De igual manera se les considera pieza clave en las técnicas de fitorremediación como fitodegradación, fitotransformación, rizodegradación, fitoextracción y fitoestabilización (De-Bashan *et al.*, 2012). La incidencia de estos microorganismos se debe además de la solubilización de fosfatos, a la producción de fitohormonas y/o a la inducción de resistencia sistemática contra un amplio espectro de patógenos (Singh *et al.*, 2011).

Los HSF juegan un rol fundamental en el ciclaje de fósforo en los suelos; gracias a su actividad, las plantas pueden aprovechar las grandes reservas de fósforo insoluble que se encuentran fijados a los minerales del suelo (Beltrán, 2014). Los MSF incluyen cepas bacterianas y fúngicas (Vera *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2009). Sin embargo, diversos estudios han determinado que los hongos, constituyen la mayor parte de la biomasa del suelo, son abundantes en suelos ácidos y poseen una habilidad mayor para solubilizar roca fosfórica que las bacterias (Gómez- Guiñan y Zabala, 2001).

Dentro del grupo de hongos destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* ya que poseen una alta capacidad de solubilización debido a que producen una gran cantidad de ácidos orgánicos (Nunes- Silva *et al.*, 2002).

Diversas investigaciones lo comprueban, Bank y Dey (1982) aislaron hongos que pertenecen al género *Penicillium*, por otra parte, Illmer y Schinner, (1992) trabajaron con la cepa del hongo *Penicillium aurantiogriseum*. Illmer *et al.*, (1994), con *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum* y *Penicillium aurantiogriseum*. Reyes *et al.*, (1998) aislaron la cepa del hongo *Penicillium rugulosum*. Narsian y Patel (2000), el hongo *Aspergillus aculeatus*. Goenadi *et al.*, (2000), *Aspergillus niger*. Khan, M. y Khan, S. (2001) dos especies *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* y *Penicillium digitatum*. Silva Filho *et al.*, (2002) *Penicillium* sp.. Nunes- Silva *et al.*, (2002), concluyeron que los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* tienen una alta capacidad de solubilización debido a que producen una gran cantidad de ácidos orgánicos. Vera *et al.*, (2002), aislaron *Trichoderma*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces* sp., *Gongronella butleri* y *Furarium oxysporum*. Souchie *et al.*, (2005) *Aspergillus niger* y cuatro bacterias solubilizadoras pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Nopparat *et al.*, (2007) las cepas de los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubigenensis*. Pandey *et al.*, (2008) *Penicillium citrinum*. Whitelaw *et al.*, (2009) *Penicillium radicum*. Morales *et al.*, (2011) *Penicillium albidum*. Hernández- Leal *et al.*, (2012) reportaron para México de manera *in vitro* la solubilización de fósforo por parte de la cepa del hongo nematófago *Paecilomyces lilacinus*. Posada *et al.*, (2012) aislaron hongos filamentosos de suelos cafetaleros de diferentes sitios de México y Colombia, tales observaron las cepas de los géneros *Fusarium* spp. y *Cylindrocarpon* spp. para Colombia y *Penicillium* spp. para México. Mahamed *et al.*, (2014) *Aspergillus niger* y *Penicillium italicum*.

Inoculaciones de HSF en cultivos

Por otra parte existen investigaciones en condiciones de invernadero que demuestran la efectividad de la inoculación de este grupo de hongos en diferentes cultivos tales como soya (Chakraborty *et al.*, 2010); garbanzo (Kapri y Tewari, 2010); lechuga (Morales *et al.*, 2011); maíz (Sing y Reddy, 2011) cacahuete (Malviya *et al.*, 2011); trigo (Sing y Reddy, 2011) amaranto (Reena *et al.*, 2013); árbol de sisú (Dash *et al.*, 2013); jitomate (Anwer y Khan, 2013) palma de aceite (Nur *et al.*, 2015); papa (Jain y Sing, 2015); garbanzo (Saxena *et al.*, 2015). De igual forma son considerados de gran importancia en la fitorremediación (De-Bashan *et al.*, 2012).

Gracias a la efectividad de este tipo de microorganismos se ha logrado la comercialización de dos importantes biofertilizantes. En 1990 Canadá lanza al mercado el biofertilizante denominado JumpStart® elaborado a base del hongo solubilizador *Penicillium bilaiae*, probado en trigo. En América Latina tal es el caso de Colombia quien comercializa el biofertilizante Fosfosol® a base del hongo solubilizador *Penicillium janthinellum* el cual ha mostrado incrementos en la producción con rangos que van del 5 al 38 % en cultivos como el arroz (Moreno *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de los sitios de muestreo

Se eligieron 4 sitios para tomar las muestras del suelo en el estado de Coahuila. Arteaga (25°13'16'' N, 100°23'44'' O y 2870 msnm); Múzquiz (27°59'N, 101°42'41'' O y 510 msnm); Cuatro Ciénegas (26°55'22'' N, 102°7'22'' O y 720 msnm) y La Muralla (26°25'34'' N, 101°19'5'' O y 940 msnm) (Figura 2).

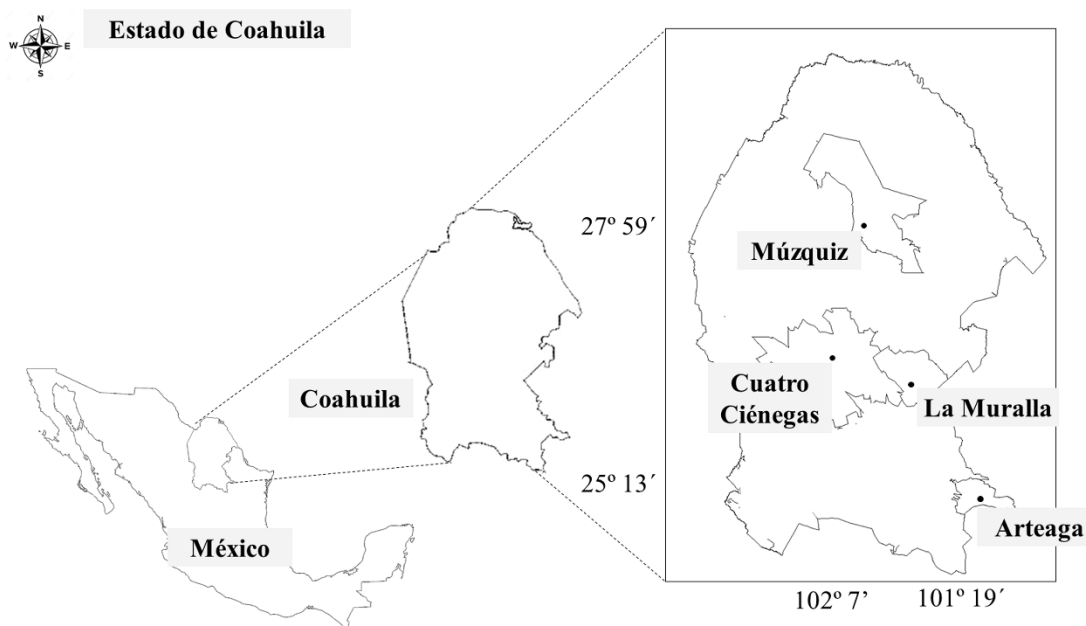


Figura 2. Localización de los sitios de estudio en el estado de Coahuila, México.

Colecta de muestras de suelo

En cada sitio se seleccionaron tres puntos de muestreo separados por una distancia de 100 m. En cada punto se tomó una muestra de suelo de 250 g a una profundidad de 0-20 cm. Posteriormente, en el laboratorio las cuatro muestras de cada punto se mezclaron para obtener una muestra mixta de cada sitio. El suelo se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 5° C hasta su procesamiento para el aislamiento de los hongos.

De cada uno de los sitios, se tomaron 100 g de suelo para realizar los análisis fisicoquímicos. El carbono orgánico (CO) se cuantificó por medio del método de Walkley-

Black modificado (Wakley y Black, 1934), el pH con potenciómetro (McKeen, 1993), la capacidad de intercambio catiónico (CIC) con acetato de amonio 1N (pH 7,0) (Henríquez *et al.*, 2005), nitrógeno total por micro-Kjeldahl (Bremner, 1965), fósforo disponible (P) por Bray 1 (Bray y Kurtz, 1945) y el fósforo fijado se cuantificó con Blakemore (Blakemore, 1981). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de análisis de suelos, plantas y agua del Instituto de Ecología A.C. Los resultados de los análisis fisicoquímicos se concentran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Características físicoquímicas del suelo de los sitios de muestreo. Fósforo (P), conductividad eléctrica (CE), retención de fósforo (RP), materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO), carbono total (C), hidrogeno total (H), nitrógeno total (N), relación carbono- nitrógeno (C/N), arcilla, limo, arena y textura.

| Sitio | pH | P | CE | RP | MO | CO | C | H | N | C/N | Arcilla Limo Arena | | | Textura |
|-----------------|-----|---------------------|---------------------|----|------|------|------|------|------|-----|--------------------|-------|-------|-----------------------------|
| | | mg Kg ⁻¹ | mS cm ⁻¹ | % | | | | | | | % | % | | |
| Arteaga | 7.4 | 18 | 0.27 | 14 | 1.73 | 9.12 | 13.2 | 1.36 | 0.59 | 22 | 53.28 | 29.64 | 17.08 | Arcilla |
| Cuatro Ciénegas | 8.6 | 4 | 2.51 | 3 | 1 | 0.58 | 1.2 | 0.78 | 0.09 | 13 | 21.28 | 3.64 | 75.08 | Migajón Arcillo- arenoso |
| La Muralla | 8.2 | 5 | 0.11 | 4 | 1.73 | 1 | 5.3 | 0.48 | 0.23 | 24 | 27.28 | 15.64 | 57.08 | Migajón Arcillo- arenoso |
| Múzquiz | 8.1 | 4 | 0.21 | 7 | 3.01 | 1.71 | 5.1 | 0.4 | 0.23 | 22 | 39.28 | 31.64 | 29.08 | Migajón Arcilloso |

Aislamiento y selección de los hongos solubilizadores de fósforo

El aislamiento de los hongos del suelo se realizó mediante la técnica de lavado de partículas (Bills *et al.*, 2004). Esta consiste en lavar 1 g de suelo con una serie de microtamices (1 mm, 500 μ m, 250 μ m y 150 μ m) con agua purificada. Se tomaron las partículas de suelo atrapadas en el tamiz de 150 μ m y se colocaron en tubos con agua destilada. Finalmente se tomaron 300 μ l de la muestra de suelo y se colocaron en medio de cultivo DBRC (rosa de bengala con dicloran y clorafenicol OXOID); las placas se incubaron por 15 días a 25°C. Una vez crecidas las colonias se transfirieron a tubos con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA BIOXON).

Para la selección de las cepas con capacidad fosfato solubilizadora se empleó un medio de cultivo revelador con 0.5 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂ (Sundara y Sinha, 1963). En las placas Petri con el medio sólido, se realizaron las inoculaciones de cada una de las cepas aisladas y se dejaron en incubación a 25°C durante tres días. La capacidad de solubilización de P

se detectó mediante la presencia de un halo hialino alrededor de la colonia (Sundara y Sinha, 1963) (Anexo 1).

Evaluación cualitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos

Una vez seleccionadas las cepas solubilizadoras de fósforo, se procedió a medir el índice de eficiencia relativa de solubilización (ERS). Se inocularon las cepas (tres repeticiones) en placas Petri con medio revelador con 0.5 g L^{-1} de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Sundara y Sinha, 1963); diariamente y durante 10 días se tomaron mediciones del diámetro del halo y el diámetro de la colonia.

El índice de eficiencia relativa de solubilización se calculó mediante la fórmula: $\text{ERS} = (\text{diámetro de la colonia} + \text{halo de solubilización} / \text{diámetro de la colonia})$ (Vitorino *et al.*, 2012). Para categorizar el nivel de solubilización de las cepas que formaron halo, se realizó una selección de acuerdo con su índice de ERS. Se establecieron tres escalas. Escala baja I= ERS de 2-3; Escala media II= ERS de 3-4 y Escala alta III= ERS de 5-6 (escala empleada por Silva Filho y Vidor, 2000).

Evaluación cuantitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos seleccionadas

Las cepas seleccionadas por su mayor índice de eficiencia relativa de solubilización se inocularon en medio líquido de Sundara (Sundara y Sinha, 1963), adicionado con 0.5 g L^{-1} de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fósforo insoluble. Los matraces fueron inoculados con cinco discos de micelio de 5 mm de diámetro de las cepas de los hongos solubilizadores seleccionadas con 15 días de crecimiento, se utilizaron tres réplicas para cada cepa incluyendo un testigo (sin hongo).

Los cultivos se incubaron en la oscuridad a 25°C durante 25 días. A partir del día cinco y cada cinco días se realizaron los muestreos. En cada muestreo, se registró el pH y la biomasa fúngica. Para obtener los extractos fúngicos, se filtran las muestras en papel filtro Whatman® 42 y se procedió a medir el contenido de fósforo. El fósforo soluble se valoró por el método del ácido ascórbico (Clesceri *et al.*, 1992); las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro a 880 nm. Los datos se compararon con una curva estándar de fósforo y se expresaron en mg L^{-1} (Anexo 2).

Evaluación del efecto de la inoculación de las cepas de hongos solubilizadores de fósforo seleccionadas y diferentes dosis de fertilizantes sobre la disponibilidad de P y el crecimiento de las plantas de jitomate.

Preparación del inóculo de los hongos solubilizadores de fósforo (HSF)

Se emplearon tres cepas de hongos solubilizadores de fósforo *Penicillium* sp. A56, *Aspergillus* sp. Mu42, *Penicillium* sp. Mu73; Éstas fueron aisladas en el Laboratorio de Micromicetos del INECOL A. C. Las cepas fueron seleccionadas debido a que presentaron la mayor cantidad de fósforo solubilizado en la fase cuantitativa. Estas fueron reactivadas en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) e incubadas a 25 °C por 15 días y las esporas fueron suspendidas en agua destilada estéril, posteriormente se realizó el conteo en una cámara de Neubauer bajo un microscopio compuesto. Cada cepa se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹, tal como lo propone Souchie *et al.*, (2010).

Desinfección de las semillas de jitomate

Las semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) var. eterno se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 50% durante 15 minutos, posteriormente se lavaron con agua estéril varias veces y se dejaron en imbibición durante 1 hora. Posteriormente se transfirieron a charolas germinadoras de poliestireno con 200 cavidades con 180 mL de sustrato y se colocaron en germinación durante 30 días en un invernadero de mediana tecnología.

Inoculación de los hongos solubilizadores de fósforo a las plantas de jitomate

Las plántulas de jitomate de un mes de crecimiento se trasplantaron a macetas de 10 kg las cuales contenían 7 kg de sustrato (peat moss y perlita 1:1 v/v). Los tratamientos establecidos fueron: 1) testigo absoluto (sin hongo/ sin fertilizante), 2) fertilizante al 25%, 3) fertilizante al 50%, 4) fertilizante al 75%, 5) fertilizante al 100%, 6) *Penicillium* sp. Mu73+25, 7) *Penicillium* sp. Mu73+50, 8) *Penicillium* sp. Mu73+75, 9) *Penicillium* sp. Mu73+100, 10) *Aspergillus* sp. Mu42+ 25, 11) *Aspergillus* sp. Mu42+50, 12) *Aspergillus* sp. Mu42+75, 13) *Aspergillus* sp. Mu42+100, 14) *Penicillium* sp. A56+25, 15) *Penicillium* sp. A56+50, 16) *Penicillium* sp. A56+75 y 17) *Penicillium* sp. A56+ 100. Se

utilizó roca fosfórica (RP) (10% soluble) como fertilizante. La dosis de fertilizante se ajustó a 12 g planta⁻¹ tal y como lo propone Torres y De Prager, (2013).

Se inocularon 6.4 mL del inóculo *Penicillium* sp. A56, 5.29 mL del inóculo *Aspergillus* sp. Mu42 y 6.08 mL del inóculo *Penicillium* sp. Mu73 (1×10^8 UFC mL⁻¹) por planta. La aplicación de los inoculantes se realizó directamente al sustrato y sobre el sistema radical de la planta. Las plantas se mantuvieron durante cuatro meses en un invernadero de mediana tecnología. El riego se realizó por goteo dos veces al día y cada tercer se les adicionó la solución nutritiva de Hewitt sin P (Hewitt, 1969) (Anexo 3).

Diseño experimental

Se estableció un diseño completamente al azar de 17 tratamientos con cinco repeticiones cada uno (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental

| Tratamientos | Repeticiones |
|----------------------------------|---------------------|
| Testigo (sin hongo) | 5 |
| Fertilizante 25% (F25) | 5 |
| Fertilizante 50% (F50) | 5 |
| Fertilizante 75% (F75) | 5 |
| Fertilizante 100% (F100) | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. Mu73+F25 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. Mu73+F50 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. Mu73+F75 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. Mu73+F100 | 5 |
| <i>Aspergillus</i> sp. Mu42+F25 | 5 |
| <i>Aspergillus</i> sp. Mu42+F50 | 5 |
| <i>Aspergillus</i> sp. Mu42+F75 | 5 |
| <i>Aspergillus</i> sp. Mu42+F100 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. A56+F25 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. A56+F50 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. A56+F75 | 5 |
| <i>Penicillium</i> sp. A56+F100 | 5 |

Una vez transcurrido el tiempo establecido, se evaluó el P disponible en el sustrato, P total radicular y foliar, número de flores, número de racimos, altura, diámetro del tallo, longitud de raíz y la tasa de crecimiento de las plantas.

Medición de fósforo disponible del sustrato de las plantas de jitomate

Para la evaluación de P disponible, se tomaron muestras del sustrato de cada uno de los tratamientos y se cuantificó el fósforo disponible mediante la técnica de Bray y Kurtz (1945). Se pesaron 2.5 g de sustrato y añadieron 25 mL de la solución extractante, después se agitaron durante 5 minutos a 180 rpm en posición vertical. Los extractos se filtraron con papel filtro Whatman (N° 42). Posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL de muestra extraída y añadieron 5 mL de reactivo combinado, se aforaron a 50 mL con agua destilada en matraces volumétricos. Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro a 882 nm expresado en mg L^{-1} (Anexo 4).

Para calcular la cantidad de fósforo soluble en el sustrato se utilizó la siguiente fórmula:

$$P(\text{mg/L}) = \text{ppm en CC} \times \text{DM} \times \text{DV}$$

donde:

ppm en CC: partes por millón en la curva de calibración

DM: dilución masa (volumen de la solución extractante)/(gramos de muestra)

DV: dilución del volumen (aforo)/(alícuota de muestra agregada)

Medición del fósforo total de la raíz y de la parte aérea de las plantas

La evaluación cuantitativa del P total foliar y de la raíz se realizó mediante el método de Murphy y Riley, (1962), para ello, se colocaron hojas y la raíz de las plantas de jitomate de cada tratamiento por separado en bolsas de papel y se secaron en una estufa a 70 °C durante 72 horas. Posteriormente se pesaron 0.25 g de hojas secas y raíz, se colocaron en crisoles de porcelana dentro de una mufla a 500 °C por 2 h (McKean, 1993). Las cenizas obtenidas se disolvieron en 25 mL de HCl 0.3 M en tubos de ensayo, los cuales se taparon y agitaron manualmente hasta disolverse. Los extractos se filtraron con papel filtro Whatman (N° 42). Una vez filtrados se tomaron 2 mL de cada muestra y se adicionaron 18 mL del reactivo combinado y se dejaron reposar durante 20 min. Las muestras se

cuantificaron en un espectrofotómetro a 660 nm y se expresaron en mg g^{-1} . La preparación de reactivos y curva de calibración se detalla en el Anexo 5.

Medición de variables agronómicas

La altura de la parte aérea de las plantas se midió con una regla, a partir del cuello de la raíz hasta el meristemo apical. Posteriormente con un vernier digital se midió de la misma forma el diámetro del tallo y longitud de raíz. La tasa de crecimiento se calculó utilizando la siguiente formula: $\text{Peso fresco total} / \text{días totales transcurridos}$.

Análisis estadísticos

En la evaluación cualitativa, para detectar diferencias entre los valores de los índices solubilización se realizaron Anovas de una vía. En la evaluación cuantitativa, se efectuaron Anova de una vía con medidas repetidas para conocer las diferencias del fósforo solubilizado entre las cepas inoculadas a través del tiempo de incubación. Cuando las diferencias fueron significativas se generaron prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para conocer la relación entre el contenido de fósforo soluble con el pH y la biomasa fúngica, se llevó a cabo un análisis de regresión simple.

Para detectar diferencias en el P disponible en el sustrato, P total en la parte aérea, P total en la raíz y las variables agronómicas, se realizó un análisis de varianza de una vía y pruebas de media de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para conocer la relación entre las variables obtenidas, se llevó a cabo un análisis de correlación. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica Ver. 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y selección de hongos fosfato solubilizadores de suelos del estado de Coahuila

Poco se ha documentado sobre los hongos del suelo en el estado de Coahuila, entre los pocos estudios publicados el de Samaniego *et al.*, 1988 quienes aislaron cepas de huertas de nogal; Samaniego y Chew, 2007 aislaron de suelo en un cultivo de alfalfa. En este estudio, a partir de las muestras de suelos de las cuatro localidades (Múzquiz, La Muralla, Arteaga y Cuatro Ciénegas) se obtuvo un total de 271 cepas de hongos del suelo. La mayor cantidad de cepas se adquirieron en el sitio de Múzquiz (84) y La Muralla (83), seguido de Arteaga (63) y finalmente Cuatro Ciénegas (41); cabe señalar que estas áreas no habían sido muestreadas, por lo que representa una importante contribución para el estado de Coahuila.

A pesar de que no se detectaron relaciones significativas de estos datos de abundancias con los parámetros fisicoquímicos de los suelos, se observa una tendencia. El sitio Arteaga presenta un mayor contenido de fósforo disponible (18 mg kg^{-1}) y carbono orgánico (9.12). Diversos estudios (Vaidya *et al.*, 2008, Posada *et al.*, 2012) demuestran el efecto estimulante del carbono orgánico en el crecimiento microbiano. Todos los microorganismos y las plantas utilizan el fósforo disponible en el suelo y, en condiciones de alta disponibilidad se incrementa su inmovilización biológica a través del desarrollo de poblaciones microbianas, incluidas las fúngicas (Rooney y Clipson, 2009).

Los hongos solubilizadores de fósforo, son parte de un gran grupo conocido como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (en sus siglas en inglés PGPM) (Beltrán- Pineda, 2014) y juegan un rol fundamental en el reciclaje de fósforo; estos microorganismos están fuertemente involucrados en la transformación del P a través de la solubilización, mineralización y de la inmovilización (Begonia *et al.*, 2004). Gracias a la efectividad de este tipo de microorganismos se ha logrado la disminución de la aplicación de fertilizantes químicos en algunos cultivos importantes como papa (Ñústez y Acevedo, 2005), maíz (Patil *et al.*, 2012) y chícharo (Ramírez *et al.*, 2013).

El empleo de las pruebas reveladoras mediante halos hialinos alrededor de la colonia en el medio sólido resultó de gran utilidad para detectar de forma relativamente sencilla y

rápida las cepas que tienen capacidad solubilizadora. La evaluación de la actividad solubilizadora reveló respuesta positiva (formación de halos hialinos alrededor de la colonia (Figura 3) en 143 de las 271 cepas evaluadas; este dato representa el 52.76 % de los aislamientos totales. La Muralla presentó 42 cepas positivas, seguido de Arteaga con 39, Múzquiz con 38 y por último Cuatro Ciénegas con 24. El sitio La Muralla presentó el mayor porcentaje de cepas solubilizadoras (29.37%), seguido de Arteaga (27.27 %), Múzquiz (26.57 %) y finalmente Cuatro Ciénegas (16.78%).

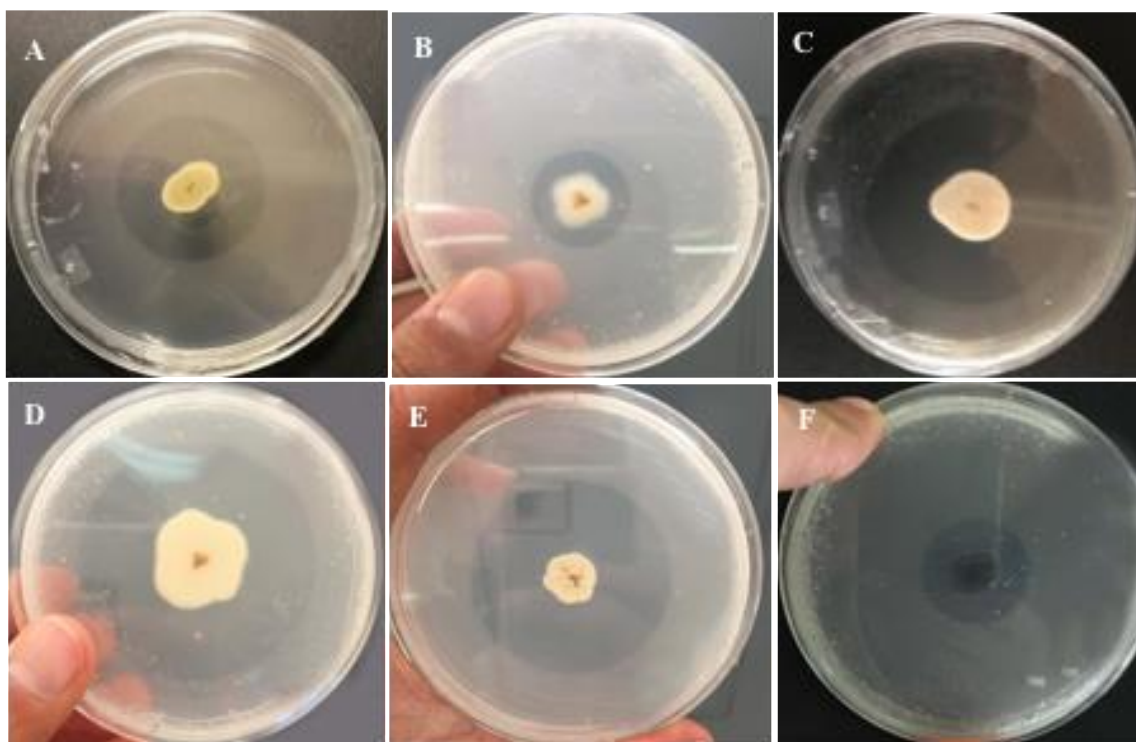


Figura 3. Halos de solubilización (zona hialina) de algunas de las cepas solubilizadoras de fósforo en medio sólido de Sundara con fosfato tricálcico a diferentes días de incubación*. **A.** Sp. Mz76 (6*); **B.** *Aspergillus* sp. 4C39 (4*); **C.** *Penicillium* sp. A51 (4*); **D.** Sp. 4C16 (6*); **E.** *Penicillium* sp. 4C37 (3*); **F.** *Cladosporium* sp. 4C20 (4*).

Evaluación cualitativa de eficiencia de solubilización de los hongos

En los resultados de la evaluación cualitativa, los índices de solubilización mostraron una variación significativa entre las cepas evaluadas ($p \leq 0.05$). Los valores de los índices de solubilización estuvieron en un rango de 2.06-6.85. De acuerdo a las escalas establecidas;

nueve cepas se ubicaron en la escala III (alta), 112 cepas en la escala II (media) y 22 cepas en la escala I (baja) de solubilización (Cuadro 5). Las cepas colocadas en la mayor escala de solubilización (III) fueron: Sp. Mu82, Sp. Mu28, *Penicillium* sp. Mu54, *Aspergillus* sp. Mu42, Sp. Mz54, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73), *Penicillium* sp. (Mu77) y *Penicillium* sp. (A56). Entre las cepas de mayor escala de solubilización se revelaron diferencias significativas entre los valores del índice de eficiencia de solubilización ($p < 0.0005$). Los valores de eficiencia de solubilización de las cepas Sp. Mz54, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. Mu77 y *Penicillium* sp. A56 fueron significativamente mayores que Sp. Mu82, Sp. Mu28, *Penicillium* sp. Mu54 y *Aspergillus* sp. Mu42 ($t < 0.005$).

La mayoría de las cepas que expresaron respuesta positiva pertenecen a los géneros de *Penicillium* y *Aspergillus*. A estos géneros se les ha relacionado como solubilizadores de fósforo en numerosas investigaciones (Rathore *et al.*, 2014, Mohamed *et al.*, 2014, Kumar *et al.*, 2014, Verma y Ekka, 2015). Existen estudios que señalan que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* poseen una alta capacidad de solubilización (Asea *et al.*, 1988; Cunningham y Kuiack, 1992; Vassilev *et al.*, 1996; Nunes-Silva *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2011; Rathore *et al.*, 2014; Gizaw *et al.*, 2017). Se ha expresado, que la capacidad solubilizadora del P por parte de los géneros indicados, está relacionada con la habilidad de producción de ácidos orgánicos (Swaby y Sperber, 1958; Roche y De Barac, 1959) y por descenso del pH (Sperber, 1985). A la fecha, la mayoría de los estudios sobre hongos solubilizadores *in vitro* se han desarrollado con diversas cepas de *Aspergillus niger* (Vassilev *et al.*, 1996; Narsian y Patel., 2000; Mohan Singh *et al.*, 2005; Ashok *et al.*, 2012; Zeroual *et al.*, 2012). Numerosos trabajos (Mesa Garriga *et al.*, 2005; Velásquez *et al.*, 2010; Paredes y Espinosa, 2010; Leal *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2012) evidencian que *A. niger* producen una gran cantidad de ácidos orgánicos tales ácido cítrico, láctico, málico, oxálico o tartárico (Paredes y Espinosa, 2010; Pérez *et al.*, 2012). En la actualidad, existen en el mercado dos biofertilizantes elaborados con cepas de *Penicillium*; *Penicillium bilaiae* es la base del producto JumpStart® elaborado en Canadá y *Penicillium janthinellum* de Fosfosol® hecho en Colombia. De acuerdo a los análisis estadísticos, las mejores cepas considerando los valores de los índices de eficiencia de

solubilización son: Sp. Mz54, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. Mu77 y *Penicillium* sp. A56.

En la medición cualitativa, la cepa *Penicillium* sp. A56, presentó el valor del índice de solubilización más alto (ERS= 6.85). Estos valores ERS pertenecen a diámetros de los halos de 3-8.2 cm. De Freitas *et al.*, (1997) sugiere que cepas que forman halos alrededor de sus colonias con diámetros superiores a 1.5 cm, se consideran buenos solubilizadores de fósforo. En la literatura, se han registrado valores de índice de solubilización de fosfato de hasta 5.3 para *Trichosporum beigeii* (Hajjam y Cherkaoui, 2017), de 3.0 para *Paecilomyces lilacinus* (Hernandez-Leal *et al.*, 2011); 2.87 para *Aspergillus* sp. (Elías *et al.*, 2016) 2.25 para *Penicillium purpurugenum* (Verma y Ekka, 2015). En esta publicación, los valores de ERS para las 9 cepas dispuestas en la escala más alta de solubilización (escala III) fueron de 5.35-6.85. Narsian y Patel (2000), Reddy *et al.*, (2002), Barroso y Nahas (2002) y Mittal *et al.*, (2008) indican que la eficiencia de disolución del fosfato tricálcico depende del tipo de fuente de fósforo utilizada, el tipo de microorganismo, así como de la calidad y cantidad de ácidos orgánicos secretados en el medio de cultivo.

Evaluación cuantitativa de la capacidad fosfato solubilizadora de las cepas de hongos seleccionadas

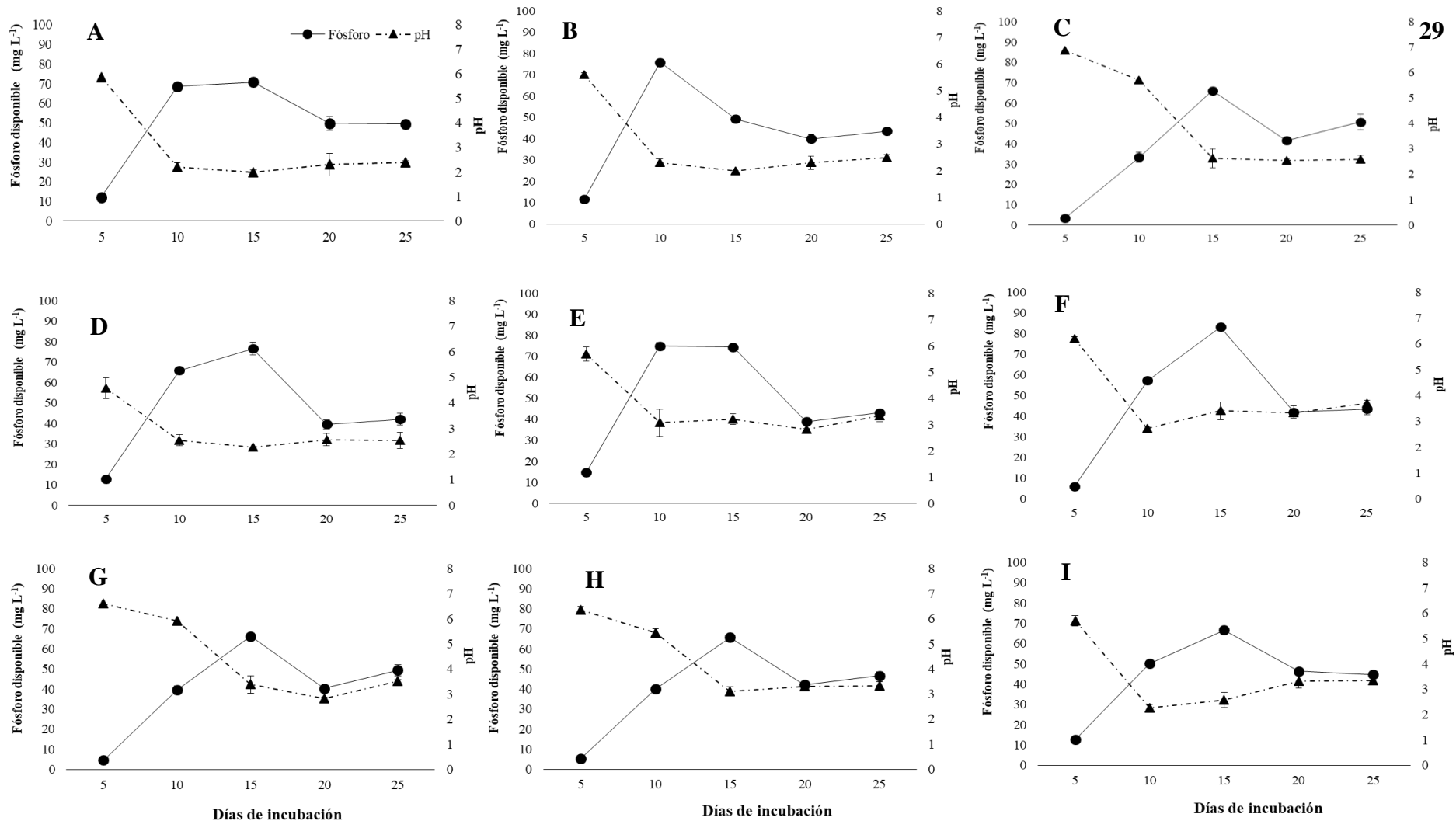
En la evaluación de eficiencia de solubilización en el medio líquido; los valores de fósforo soluble mostraron una variación significativa entre las nueve cepas evaluadas ($p \leq 0.05$) y a través de los días de incubación ($p \leq 0.05$). El día de máxima solubilización en la mayoría de las cepas fue el día 15 de incubación. En el día de máxima actividad solubilizadora, el rango de solubilización fue de 65.84–83.26 mg L⁻¹. La cepa *Penicillium* sp. Mu73 exhibió la mayor concentración de fósforo soluble ($t < 0.00005$) (Figura 4). En el tratamiento control, el rango de solubilización fue de 2.8-12.6 mg L⁻¹.

Cuadro 5. Índice de eficiencia de solubilización (ERS) (día de máxima solubilización) y escala de solubilización de las cepas de hongos fosfato solubilizadoras aisladas de los sitios de estudio: Arteaga (A), La Muralla (Mu), Múzquiz (Mz) y Cuatro Ciéneas (4C).

| Spp. | Clave | ERS | Escala | Spp. | Clave | ERS | Escala | Spp. | Clave | ERS | Escala |
|------------------------|-------|-----------|--------|-------------------------|-------|-----------|--------|-------------------------|-------|-----------|--------|
| Sp. | Mu47 | 2.06 (3) | I | Sp. | 4C16 | 3.41 (6) | II | <i>Fusarium</i> sp. | A41 | 4.23 (7) | II |
| <i>Trichoderma</i> sp. | Mz34 | 2.32 (3) | I | Sp. | Mu61 | 3.42 (8) | II | Sp. | Mu34 | 4.24 (5) | II |
| Sp. | Mz11 | 2.34 (7) | I | <i>Fusarium</i> sp. | A40 | 3.43 (3) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | 4C17 | 4.26 (4) | II |
| Sp. | Mu43 | 2.36 (4) | I | <i>Acremonium</i> sp. | Mu19 | 3.47 (5) | II | Sp. | Mu44 | 4.26 (7) | II |
| Sp. | Mz62 | 2.44 (5) | I | Sp. | Mz20 | 3.47 (3) | II | Sp. | Mu50 | 4.27 (9) | II |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Mu20 | 2.46 (5) | I | Sp. | 4C9 | 3.50 (11) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A57 | 4.27 (6) | II |
| Sp. | Mz71 | 2.49 (7) | I | <i>Penicillium</i> sp. | Mu24 | 3.50 (7) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A50 | 4.31 (6) | II |
| <i>Fusarium</i> sp. | Mz82 | 2.50 (6) | I | <i>Penicillium</i> sp. | A9 | 3.52 (8) | II | <i>Penicillium</i> sp. | Mu14 | 4.32 (6) | II |
| Sp. | 4C25 | 2.50 (6) | I | Sp. | Mz40 | 3.52 (10) | II | Sp. | Mu5 | 4.34 (6) | II |
| Sp. | Mz29 | 2.50 (8) | I | Sp. | 4C27 | 3.54 (8) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | Mz58 | 4.35 (8) | II |
| <i>Penicillium</i> sp. | Mu10 | 2.59 (4) | I | Sp. | A15 | 3.57 (7) | II | Sp. | Mz19 | 4.36 (5) | II |
| Sp. | A27 | 2.73 (3) | I | <i>Trichoderma</i> sp. | Mu21 | 3.58 (6) | II | Sp. | A54 | 4.38 (9) | II |
| Sp. | Mz70 | 2.79 (3) | I | <i>Cladosporium</i> sp. | 4C20 | 3.60 (8) | II | Sp. | Mu83 | 4.38 (9) | II |
| Sp. | Mu72 | 2.80 (3) | I | <i>Penicillium</i> sp. | 4C37 | 3.61 (3) | II | Sp. | Mz76 | 4.38 (9) | II |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Mz45 | 2.81 (4) | I | <i>Penicillium</i> sp. | Mz83 | 3.63 (4) | II | Sp. | A26 | 4.38 (4) | II |
| Sp. | A13 | 2.82 (3) | I | <i>Acremonium</i> sp. | Mz17 | 3.66 (4) | II | Sp. | A36 | 4.40 (8) | II |
| Sp. | A4 | 2.82 (3) | I | <i>Penicillium</i> sp. | A43 | 3.66 (3) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A53 | 4.42 (6) | II |
| Sp. | Mz53 | 2.89 (7) | I | Sp. | Mu67 | 3.67 (10) | II | <i>Penicillium</i> sp. | Mu53 | 4.44 (3) | II |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Mz63 | 2.91 (5) | I | <i>Penicillium</i> sp. | Mu32 | 3.69 (9) | II | Sp. | 4C35 | 4.45 (12) | II |
| Sp. | Mz25 | 2.93 (3) | I | Sp. | A60 | 3.70 (5) | II | <i>Penicillium</i> sp. | Mu36 | 4.47 (3) | II |
| <i>Penicillium</i> sp. | A24 | 2.95 (4) | I | <i>Penicillium</i> sp. | A38 | 3.75 (3) | II | Sp. | 4C34 | 4.48 (3) | II |
| Sp. | A46 | 2.97 (9) | I | <i>Fusarium</i> sp. | Mz36 | 3.75 (5) | II | <i>Myrothecium</i> sp. | Mu33 | 4.48 (8) | II |
| Sp. | A16 | 3.00 (5) | II | Sp. | Mz65 | 3.76 (9) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A10 | 4.49 (9) | II |
| Sp. | 4C23 | 3.13 (4) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A21 | 3.77 (5) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A58 | 4.49 (5) | II |
| Sp. | Mz35 | 3.13 (3) | II | Sp. | Mu18 | 3.77 (8) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A14 | 4.53 (5) | II |
| Sp. | A17 | 3.16 (9) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | Mz24 | 3.78 (5) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A51 | 4.54 (4) | II |
| <i>Fusarium</i> sp. | Mu6 | 3.16 (3) | II | Sp. | A23 | 3.80 (8) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A45 | 4.59 (3) | II |
| Sp. | Mu30 | 3.16 (6) | II | Sp. | Mu63 | 3.81 (7) | II | Sp. | A39 | 4.66 (6) | II |
| Sp. | Mu9 | 3.19 (9) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | 4C1 | 3.82 (9) | II | Sp. | Mz44 | 4.67 (6) | II |
| Sp. | A25 | 3.19 (3) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A35 | 3.83 (5) | II | <i>Cladosporium</i> sp. | 4C22 | 4.85 (12) | II |
| <i>Penicillium</i> sp. | A42 | 3.2 (3) | II | Sp. | Mz52 | 3.83 (5) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A11 | 4.90 (10) | II |
| Sp. | 4C3 | 3.2 (10) | II | <i>Fusarium</i> sp. | Mz68 | 3.84 (9) | II | Sp. | Mu59 | 4.94 (3) | II |
| Sp. | Mu15 | 3.21 (9) | II | Sp. | Mz74 | 3.89 (4) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | 4C15 | 4.96 (7) | II |
| Sp. | Mu49 | 3.21 (3) | II | Sp. | Mz75 | 3.89 (8) | II | Sp. | 4C2 | 4.97 (11) | II |
| Sp. | 4C10 | 3.21 (6) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | 4C12 | 3.90 (10) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | 4C39 | 4.97 (12) | II |
| Sp. | M80 | 3.22 (3) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A2 | 3.91 (3) | II | Sp. | Mu35 | 4.98 (7) | II |
| Sp. | 4C32 | 3.24 (10) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | Mz66 | 3.91 (9) | II | Sp. | Mz60 | 4.98 (9) | II |
| Sp. | Mu27 | 3.25 (8) | II | <i>Fusarium</i> sp. | Mz3 | 3.91 (6) | II | <i>Fusarium</i> sp. | Mu52 | 4.99 (6) | II |
| <i>Penicillium</i> sp. | Mu1 | 3.26 (3) | II | Sp. | A37 | 3.92 (5) | II | Sp. | Mu82 | 5.35 (6) | III |
| Sp. | 4C29 | 3.28 (11) | II | Sp. | Mz46 | 3.92 (9) | II | Sp. | Mu28 | 6.03 (7) | III |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Mu70 | 3.28 (6) | II | Sp. | 4C38 | 3.97 (11) | II | <i>Penicillium</i> sp. | Mu54 | 6.26 (11) | III |
| <i>Fusarium</i> sp. | Mu7 | 3.28 (8) | II | Sp. | A49 | 3.97 (5) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | Mu42 | 6.60 (8) | III |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Mz73 | 3.29 (5) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A59 | 4.06 (4) | II | Sp. | Mz54 | 6.71 (7) | III |
| <i>Fusarium</i> sp. | Mz15 | 3.31 (8) | II | Sp. | Mz2 | 4.09 (9) | II | <i>Aspergillus</i> sp. | 4C19 | 6.73 (6) | III |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Mu17 | 3.38 (9) | II | Sp. | Mu2 | 4.13 (7) | II | <i>Penicillium</i> sp. | Mu73 | 6.78 (5) | III |
| <i>Penicillium</i> sp. | A47 | 3.38 (5) | II | Sp. | 4C21 | 4.13 (6) | II | <i>Penicillium</i> sp. | Mu77 | 6.82 (7) | III |
| <i>Myrothecium</i> sp. | A34 | 3.39 (9) | II | Sp. | Mz4 | 4.14 (9) | II | <i>Penicillium</i> sp. | A56 | 6.85 (10) | III |
| Sp. | 4C36 | 3.40 (10) | II | Sp. | Mz47 | 4.22 (8) | II | | | | |

En el presente trabajo las cepas evaluadas cuantitativamente revelaron diferentes niveles de actividad de solubilización de fosfato en medio de cultivo líquido. Las cepas *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. A56 y *Aspergillus* sp. Mu42 propiciaron la mayor concentración de fósforo soluble en lo matraces. La cepa Mu73 aumentó la mayor concentración de fósforo respecto al control (70.6 mg L⁻¹ el día 15). Es importante señalar que, para la mayoría de las cepas, el día 15 de incubación ocurrió la mayor solubilización de fósforo. Este resultado concuerda con Mohamed *et al.*, (2014); Moreno Quevedo *et al.*, (2015) y Selvi *et al.*, (2017), quienes están de acuerdo que la solubilización máxima de fosfato sucede durante el día 15 de incubación bajo condiciones controladas.

Comparado los resultados, se observa que los valores de fósforo solubilizado en este estudio son mayores a los reportados para una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Hernandez-Leal *et al.*, 2011); para diferentes cepas de *Penicillium* (Morales *et al.*, 2011) *Penicillium aurantiogriseum* y *P. claviformis* (Saxena *et al.*, 2013); cepas *Mucor* sp y *Penicillium* sp. (Rathore *et al.*, 2014); *Penicillium* sp. (Moreno Quevedo *et al.*, 2015); para *Geomyces pannorum* (Lima-Rivera *et al.*, 2016) y para cepas de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Selvi *et al.*, 2017). Fueron similares a las obtenidas para *Aspergillus niger* (Saxena *et al.*, 2013, Moreno Quevedo *et al.*, 2015) para *Paecilomyces carneus* (Lima-Rivera, 2016). Sin embargo, la concentración de fósforo disuelto fue menor que los reportados para *Aspergillus* sp. (Rathore *et al.*, 2014); *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.



A través de un análisis de regresión lineal simple se corroboró que el contenido de fósforo soluble se relaciona de manera negativa y fuertemente significativa con el pH del medio de cultivo ($p < 0.005$) (Figura 5). La relación entre el fósforo soluble y la biomasa fúngica no fue significativa ($p > 0.005$). La concentración de fósforo soluble en todas las cepas evaluadas aumenta a medida que el pH del medio decrece; sin embargo, en el tratamiento control el pH se mantiene sin descender. Los resultados sugieren la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los hongos, cuyas propiedades quelantes favorecen la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación del fosfato (Fernández *et al.*, 2005). Estos resultados experimentales concuerdan con estudios previos (Pandey *et al.*, 2008, Saxena *et al.*, 2013, Selvi *et al.*, 2017). Whitelaw *et al.*, 1997; Pradhan y Sukla, (2005) y Varsha *et al.*, 2010) quienes mencionan que los microorganismos fosfato solubilizantes disuelven el fosfato insoluble mediante la producción de ácidos inorgánicos u orgánicos, lo que resulta en la caída de los valores de pH. En este estudio, el cultivo que se obtuvo la mayor concentración de fosfato soluble tuvo una significativa caída de pH a 2.5.

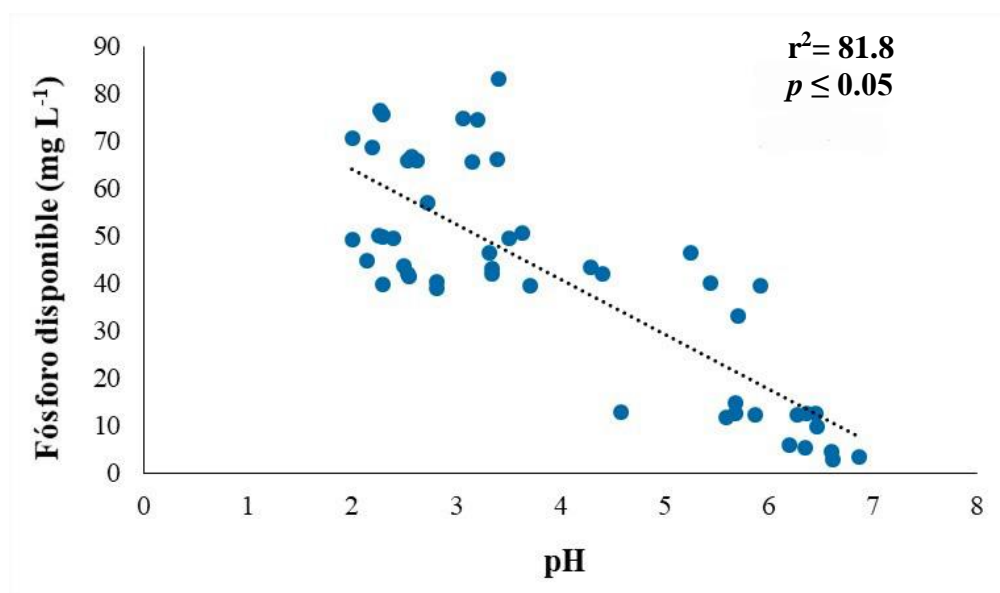


Figura 5. Relación entre el fósforo soluble y el pH producido en medio de cultivo líquido con fosfato tricálcico inoculado con las cepas fosfato solubilizadoras después de 5, 10, 15, 20 y 25 días de incubación.

Evaluación del efecto de la inoculación de las cepas de hongos solubilizadores de fósforo seleccionadas y diferentes dosis de fertilizantes orgánicos sobre la disponibilidad de P y el crecimiento de las plantas de jitomate.

Fósforo disponible en el sustrato

Para el fósforo disponible en el sustrato, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) (Figura 6A). Los resultados obtenidos para el fósforo disponible en el sustrato son prometedores, ya que las plantas inoculadas con los hongos solubilizadores después de cuatro meses en el invernadero, presentaron un incremento del 271.31 % respecto a los tratamientos testigos.

El P disponible en el sustrato de las plantas inoculadas con el tratamiento *Penicillium* sp. en conjunto con la dosis de fertilizante de 45% (Mu73+ F75) fue significativamente mayor que el resto de los tratamientos ($p \leq 0.05$); este tratamiento incremento 226.82 % el contenido de fósforo. Estos resultados son superiores a los reportados por Sibi (2011) quien logró un incremento de 164.62 % de P disponible en el sustrato en plantas de jitomate inoculadas con el hongo *Aspergillus awamori*, Morales *et al.*, (2011) reportan incrementos del 14.11 % de P en lechugas inoculadas con la cepa *Penicillium albidum*, Lima- Rivera *et al.*, (2016) consiguieron incrementos de 47.4 % y 35.6 % en plantas de avena inoculadas con los hongos *Paecilomyces carneus* y *Geomyces pannorum*. En todos estos trabajos se utilizó roca fosfórica como fuente de fósforo. No obstante, los incrementos de fosforo también fueron mayores que en estudios donde utilizaron fuentes de fosforo sintéticos fosfatados. Chakraborty *et al.*, (2010) alcanzaron un incremento del 51.23% de P en plantas de soya con *Aspergillus niger*; Wang *et al.*, (2014) obtuvieron un incremento del 63.08 % en col con una cepa *Aspergillus niger* y Chandra *et al.*, (2016) alcanzaron 81.25 % en plantas de trigo con *Penicillium bilaii*.

Los resultados en esta investigación en el P disponible en el sustrato sugieren un efecto favorable por parte de los hongos utilizados en esta investigación (*Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.) sobre el uso de fuentes de P orgánicas para las plantas, como la roca fosfórica. Esto evidencia la posibilidad de reducir o sustituir la aplicación de fertilizantes fosfatados sintéticos por fuentes orgánicas de fósforo que al ser combinadas con cepas de

hongos capaces de solubilizar el P logran dejar disponible una mayor cantidad de fósforo soluble a un menor costo y sin dañar el medio ambiente (Velázquez *et al.*, 2017).

Fósforo total en la parte aérea

La variable fósforo total en la parte aérea, mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) (Figura 6B). Los tratamientos inoculados con las cepas de los hongos solubilizadores en combinación con la dosis de fertilización orgánica presentaron valores de P significativamente mayores a los tratamientos con solo fertilización y el testigo (F100, F75, F50, F25 y T) ($p \leq 0.05$).

La concentración de P total en la parte aérea en las plantas de jitomate osciló en un rango de 7.4 a 11.1 mg g⁻¹, cabe señalar que los rangos estándar de concentración de P foliar en cultivos de jitomate en etapa madura son de 3 a 9 mg g⁻¹ (Jones, 1999).

Los tratamientos con las cepas *Aspergillus* sp. en combinación con la fertilización de 25% (Mu42+F25) y *Penicillium* sp. con fertilización al 50% (A56+F50) exhibieron los mayores incrementos de 258.06 % de fósforo respecto al testigo.

Al comparar los incrementos reportados para esta investigación con trabajos similares en plantas con roca fosfórica y los hongos solubilizadores en condiciones de invernadero resultan superiores a los de García- López *et al.*, (2015) quienes consiguieron un incremento del 35.29 % de P aéreo en pepino con *Trichoderma asperellum*, Elías *et al.*, (2016) 25.58 y 20.93 % de P aéreo en plantas de frijol con *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., Ramírez *et al.*, (2013) reportan 150 % de incrementos en el P aéreo en plantas de chicharo con *Mortierella* sp. y a los de Steiner *et al.*, (2016) quienes alcanzaron 87.5 % de incremento en el P aéreo en plantas sorgo con *Aspergillus terreus*.

En los resultados obtenidos del P total en la parte aérea, se demostró una mayor cantidad de fósforo total aéreo con las dosis de roca fosfórica de 50 y 25% (*Aspergillus* sp. A56+50 y *Penicillium* sp. M42+25). Por lo que resulta interesante comparar los incrementos obtenidos en esta investigación con trabajos similares en condiciones de invernadero fertilización fosforada sintética. Núñez y Acevedo, (2005) logran un incremento del 126.66 % con *Penicillium janthinellum* en papa con superfosfato triple, Malviya *et al.*, (2011) reportan incrementos del 34.14 % con *Aspergillus niger* y 21.95 % con *Penicillium notatum* en plantas de cacahuate con fosfato tricálcico, Patil *et al.*, (2012)

obtuvieron incrementos del 69.56 % de P aéreo con *Penicillium bilaji* en maíz con fosfato diamónico (DAP) y a los de Chandra *et al.*, (2016) quienes mencionan incrementos del 81.25 % en trigo inoculado con *Penicillium bilaji* y superfosfato.

Considerando estos resultados, se puede inferir que en dosis bajas de fertilizante orgánico (50 y 25 %) el uso de hongos fosfato solubilizadores es más efectiva; debido a que les brinda las condiciones favorables para lograr los procesos de solubilización en la producción de ácidos orgánicos o en la mineralización (Begonia *et al.*, 2004).

Por otra parte la comparación de los resultados obtenidos de la inoculación de cepas nativas de hongos solubilizadores en combinación con roca fosfórica versus la aplicación de fertilizantes sintéticos fosfatados son de gran relevancia, ya que podemos observar que se logran alcanzar incrementos en el P total aéreo superiores que con aplicaciones de fertilizantes químicos, por lo que podría reducir aplicaciones excesiva de fertilizantes químicos en cultivos como el jitomate en condiciones de invernadero. Además, incidir en los productores sobre el uso de estos hongos nativos como una alternativa para la aplicación de los biofertilizantes en conjunto con la roca fosfórica, adoptando de esta manera nuevas estrategias que vayan en aumento en la concientización sobre el cuidado del ambiente, una reducción en los costos de producción, la conservación y recuperación de los suelos, así como mantener la biodiversidad (Fernández y Rodríguez, 2015).

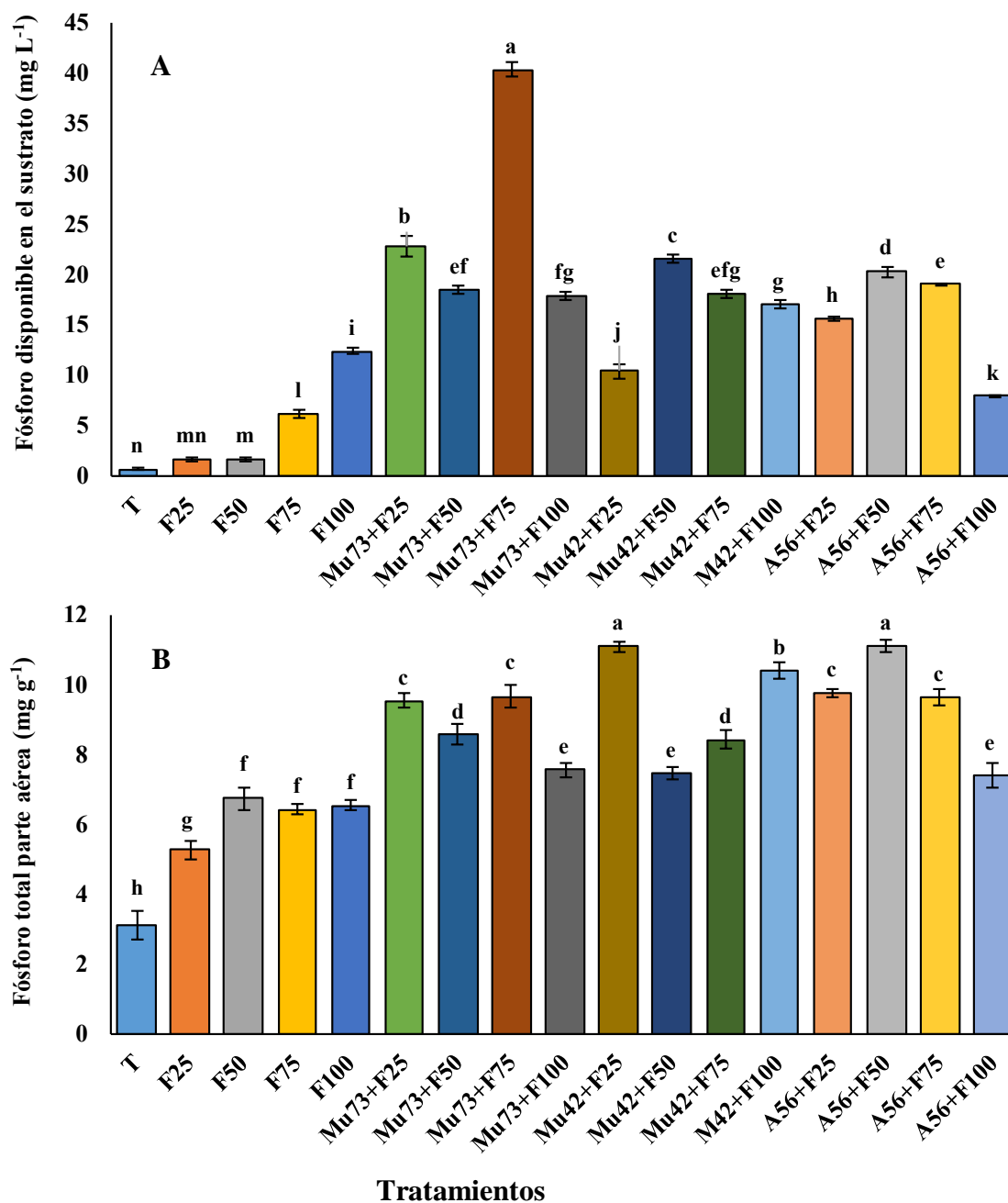


Figura 6. A) Fósforo disponible en el sustrato y B) Fósforo total en la parte aérea de las plantas de jitomate inoculadas con los hongos solubilizadores de fósforo y diferentes dosis de fertilización orgánica. Testigo: T; Fertilización 25% (F25); Fertilización 50% (F50); Fertilización 100% (F100); *Penicillium* sp (Mu73); *Aspergillus* sp. (Mu42); *Penicillium* sp. (A56). Los datos son los promedios de 5 repeticiones \pm desviación estándar. Letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

Variables agronómicas de las plantas de jitomate

Entre los beneficios que producen la inoculación de hongos solubilizadores de fósforo en plantas hortícolas destacan las siguientes: facilitan su nutrición, crecimiento y desarrollo; mejoran su tolerancia frente a diferentes tipos de estrés y a los agentes patógenos; facilitan la adaptación a diferentes tipos de suelos y contribuyen con la disminución de la erosión del suelo (Ruiz- Lozano *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2011). Estos beneficios son la base fundamental que le permite a la planta mayor adaptación al medio, mayor competencia con las plantas acompañantes no inoculadas y mayor productividad (Molina *et al.*, 2005).

Los beneficio por parte de los hongos solubilizadores en las variables agronómicas ya habían sido estudiado en investigaciones previas en condiciones de invernadero en diferentes cultivos tales como soya (Chakraborty *et al.*, 2010); garbanzo (Kapri y Tewari, 2010); lechuga (Morales *et al.*, 2011); maíz (Sing y Reddy, 2011) cacahuete (Malviya *et al.*, 2011); trigo (Sing y Reddy, 2011) amaranto (Reena *et al.*, 2013); jitomate (Anwer y Khan, 2013) papa (Jain y Sing, 2015) y garbanzo (Saxena *et al.*, 2015). Por lo que su rol en la transformación del P es de gran importancia.

En este estudio, para todas las variables agronómicas las diferencias entre los tratamientos fueron significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 7 y 8). Los mayores valores en el número de flores, racimos, diámetro del tallo y altura resultaron con los tratamientos *Aspergillus* sp. Mu42 y *Penicillium* sp. A56 bajo las dosis de 25 y 50% (Figura 7 y 8). Para todas estas variables agronómicas, los valores fueron fue significativamente mayores en las plantas inoculadas con los hongos solubilizadores que con los tratamientos exclusivos de fertilización (F100, F75, F50, F25) ($p \leq 0.05$). Mediante el análisis de correlación lineal simple se corroboró que existe una relación positiva y significativa del fósforo del sustrato y del fósforo de la parte aérea con el número de flores, diámetro de tallo, la altura y la tasa de crecimiento ($p \leq 0.05$) (Cuadro 6).

La variable número de flores y el número de racimos es uno de los componentes principales que se puede considerar un indicativo del rendimiento en la producción de las plantas de jitomate (Ramírez Vargas y Nienhuis, 2012) por lo que su medición es de gran importancia. Algunos estudios concuerdan con esta teoría, Machaco *et al.*, (2007) evaluaron diferentes tipos de racimos/planta en dos híbridos comerciales de jitomate

(Heinz 9780 y Kátia) en condiciones de invernadero; sus resultados indicaron que a medida que se aumentó el número de racimos/ planta, la producción total y comercial fue mayor. Así mismo, Mueller y Wamser, (2009) evaluaron los racimos/planta, y encontraron aumento en la producción total en función del número de racimos por planta. El beneficio que ofrece el uso de los hongos, fue notorio en los resultados obtenidos para la altura de las plantas de jitomate ya que al final del experimento se alcanzó una altura máxima de 106 cm versus 58 a 70 cm en los tratamientos con las diferentes dosis de fertilizantes y el testigo (F25, F50, F75, F100 Y T). Existen estudios que demuestran la efectividad de estos hongos para incrementar la altura de las plantas por ejemplo en plantas de jitomate con *Aspergillus awamori* (Sibi, 2011), cultivos arroz con *Trichoderma harzianum* (Borges *et al.*, 2015); en plantas de avena inoculadas con el hongo solubilizador *Paecilomyces carneus* (Lima Rivera *et al.*, 2016); en frijol con *Aspergillus* sp (Elías *et al.*, 2016) y en plantas de trigo inoculadas con *Penicillium bilaji* (Chandra *et al.*, 2016). Sin embargo, el incremento alcanzado en este trabajo utilizando además de hongos solubilizadores roca fosfórica como fuente de fósforo, resultó superior a los trabajos publicados anteriormente.

Es interesante mencionar la longitud de las raíces de las plantas sin hongos, con las diferentes dosis de fertilización (F25, F50, F75 y F100) mostraron mayores valores que con en los tratamientos conjuntos de hongos y fertilización orgánica. Estos resultados pudieran ser debido a que, dadas las condiciones de poca disponibilidad de nutrientes en que se encontraban las plantas, las raíces se extendieron en busca del nutriente (Barea *et al.*, 2008). Además, otro suceso interesante de mencionar es que la longitud de raíz de la mayoría de los tratamientos con los hongos solubilizadores a excepción de *Penicillium* sp. A56+F100, presentaron valores estadísticamente inferiores a los tratamientos testigos, esto probablemente se deba a que la inoculación con las cepas de los solubilizadores proporcionó una mayor concentración de nutrientes a la planta, por lo que no fue necesaria la elongación de la raíz ya que los nutrientes se encontraban de manera directa (Barea *et al.*, 2008). A través del análisis lineal simple se corroboró que la longitud de raíz se relaciona de manera negativa y significativa con el P disponible en el sustrato y el P total en la parte aérea ($p \leq 0.05$) (Cuadro 6).

En la variable de tasa de crecimiento, las plantas inoculadas con el tratamiento *Penicillium* sp. A56 con la dosis de fertilización del 25% (F25) mostraron valores estadísticos superiores que el resto de los tratamientos ($p \leq 0.05$). Todos los tratamientos fueron estadísticamente superiores que el tratamiento testigo ($p \leq 0.05$) (Figura 7H).

Los hongos solubilizadores de fósforo tiene la capacidad de producir y sintetizar ácidos orgánicos, enzimas y fitohormonas (Cubillos *et al.*, 2009), por lo que se sugiere que estos mecanismos son los responsables del aumento en la solubilización de las distintas fuentes de P, debido a esto la plantas aumentan su capacidad de absorción de nutrientes y por lo tanto su crecimiento (Moreno *et al.*, 2007).

Del mismo modo autores como Richardson y Simpson, (2011) señalan que la inoculación con hongos solubulizadores en cultivos hortícolas logran aumentar el crecimiento de raíces al estimular el crecimiento del pelo radicular a través de la producción de fitohormonas, o la alteración de la membrana de la raíz y el flujo de salida de iones.

Así mismo Idriss *et al.*, (2002) mencionan que los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* producen enzimas extracelulares denominadas fitasas las cuales estimulan el crecimiento vegetal ya que logran aumentar la disponibilidad de fosfatos. Del mismo modo Ghaham y Miller, (2015) indican que los microorganismos solubilizadores pueden excretar enzimas con actividad fosfatasa que hidrolizan mono, di y tri ésteres de fosfato y ácidos orgánicos los cuales incrementan la disponibilidad del fósforo.

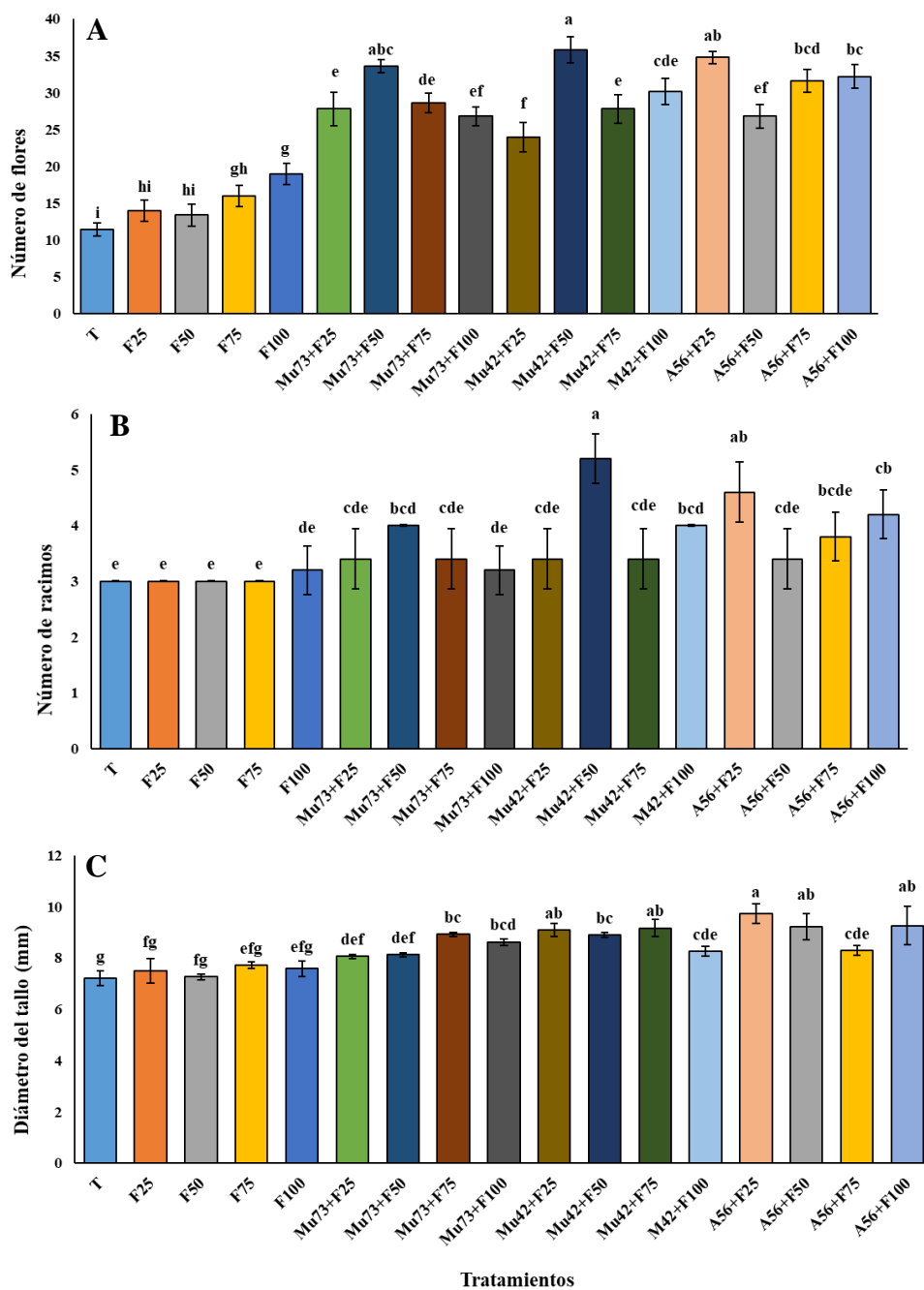


Figura 7. A) Número de flores, B) Número de racimos y C) Diámetro del tallo de las plantas de jitomate inoculadas con los hongos solubilizadores de fósforo y diferentes dosis de fertilización orgánica. Testigo: T; Fertilización 25% (F25); Fertilización 50% (F50); Fertilización 100% (F100); *Penicillium* sp (Mu73); *Aspergillus* sp. (Mu42); *Penicillium* sp. (A56). Los datos son los promedios de 5 repeticiones \pm desviación estándar. Letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

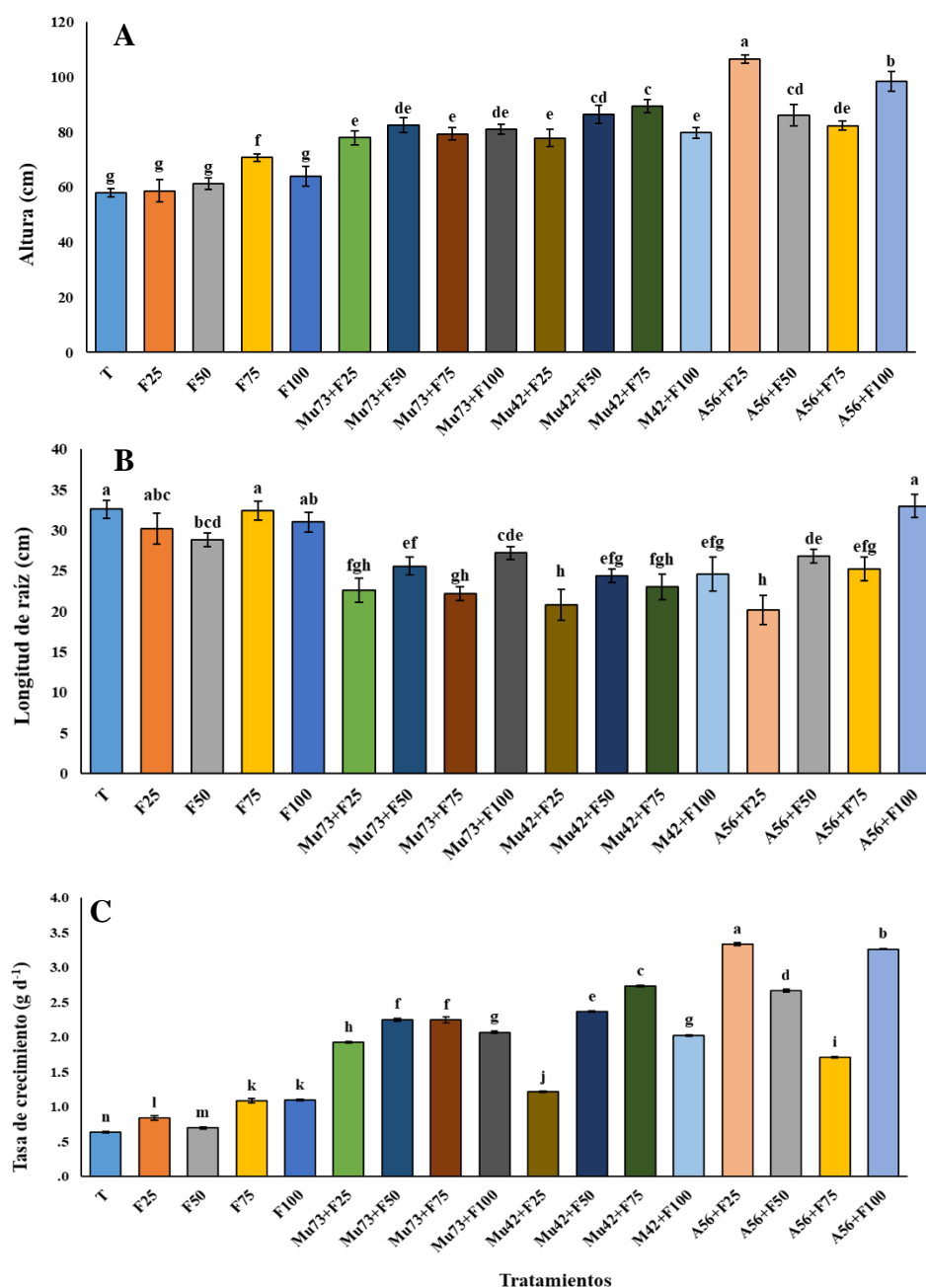


Figura 8. A) Altura, B) Longitud de raíz y C) Tasa de crecimiento de las plantas de jitomate inoculadas con los hongos solubilizadores de fósforo y diferentes dosis de fertilización orgánica. Testigo: T; Fertilización 25% (F25); Fertilización 50% (F50); Fertilización 100% (F100); *Penicillium* sp (Mu73); *Aspergillus* sp. (Mu42); *Penicillium* sp. (A56). Los datos son los promedios de 5 repeticiones \pm desviación estándar. Letras idénticas entre las columnas indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

Cuadro 6. Correlación lineal simple entre las variables agronómicas evaluadas, fósforo total en la parte aérea (PA), fósforo disponible en el sustrato (PS), número de flores (NF), número de racimos (NR), diámetro del tallo (DT), altura (A), longitud de raíz (LR) y tasa de crecimiento (TC) de las plantas de jitomate inoculadas con los hongos solubilizadores de fósforo.

| Variables | PA | PS | NF | NR | DT | A | LR | TC |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PA | 1.00 | 0.63 | 0.66 | 0.33 | 0.67 | 0.61 | -0.77 | 0.54 |
| PS | 0.63 | 1.00 | 0.67 | 0.33 | 0.52 | 0.46 | -0.65 | 0.54 |
| NF | 0.66 | 0.67 | 1.00 | 0.82 | 0.77 | 0.87 | -0.61 | 0.86 |
| NR | 0.33 | 0.33 | 0.82 | 1.00 | 0.59 | 0.72 | -0.40 | 0.67 |
| DT | 0.67 | 0.52 | 0.77 | 0.59 | 1.00 | 0.91 | -0.60 | 0.87 |
| A | 0.61 | 0.46 | 0.87 | 0.72 | 0.91 | 1.00 | -0.51 | 0.95 |
| LR | -0.77 | -0.65 | -0.61 | -0.40 | -0.60 | -0.51 | 1.00 | -0.43 |
| TC | 0.54 | 0.54 | 0.86 | 0.67 | 0.87 | 0.95 | -0.43 | 1.00 |

*Números en rojo indican una correlación significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$).

En este trabajo tal como se planteó en la hipótesis la inoculación con hongos solubilizadores favoreció la disponibilidad de P para las plantas de jitomate a nivel de invernadero y se vio reflejado en un mayor desarrollo y productividad de las plantas inoculadas.

Las cepas *Aspergillus* sp. Mu42 con 25% de roca fosfórica y *Penicillium* sp. A56 con 50% de roca fosfórica propiciaron una mayor disponibilidad de P foliar en las plantas, evidenciándose esto en las variables agronómicas. Dada la importancia de los hongos solubilizadores de fósforo en los procesos de solubilización, su aplicación en los cultivos resulta de gran importancia, se propone continuar con investigaciones que permitan evaluar el efecto de la inoculación de este tipo de microorganismos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas a nivel de campo. Además, es importante continuar con la investigación de cepas nativas solas o en consorcio para detectar cepas o consorcios con alto potencial para ser utilizadas como biofertilizantes, así mismo estudiar inoculaciones combinadas de hongos solubilizadores de fósforo con otro tipo de microorganismos como las micorrizas, también apoyarse de herramientas moleculares para el monitoreo del P en las plantas y de las poblaciones microbianas inoculadas con el fin de detectar posibles cambios en las comunidades fúngicas nativas.

CONCLUSIONES

- Los suelos muestreados del estado de Coahuila resguardan un alto porcentaje de cepas de hongos con capacidad para solubilizar fósforo.
- La mayoría de las cepas que expresaron respuesta positiva pertenecen a los géneros de *Penicillium* y *Aspergillus*.
- De acuerdo con la evaluación cualitativa, las mejores cepas fueron Sp. Mz54, *Aspergillus* sp. 4C19, *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. Mu77 y *Penicillium* sp. A56.
- Considerando los resultados de la evaluación cuantitativa, las cepas *Penicillium* sp. Mu73, *Penicillium* sp. A56 y *Aspergillus* sp. Mu42 propiciaron la mayor concentración de fósforo soluble *in vitro*.
- A nivel de invernadero, el tratamiento *Aspergillus* sp. 42 con 25% de roca fosfórica y *Penicillium* sp. A56 con 50% de roca fosfórica incrementaron la disponibilidad de fósforo en la parte aérea de las plantas de jitomate, esto se vio reflejado en un mayor desarrollo de las plantas.

REFERENCIAS

- Alexander, M. (1987). Introduction of soil microbiology. Wiley and Sons. Nueva York, EE.UU. 2a. edición. 83-88 p.
- Asea, P. Kucey, R. Stewart, B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 20(4): 459-464.
- Ashok, V. G. Sabina, S. S. Preeti, G. D. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere (soil). *International Journal of Science Innovation and Discoveries*. 2: 310-315.
- Armenta, A. García, C. Camacho, R. Apodaca, M. Gerardo, L. Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 6(1): 51-56.
- Anwer, M.A. Khan, M.R. (2013). *Aspergillus niger* as tomato fruit (*Lycopersicum esculentum* Mill.) quality enhancer and plant health promoter. *Journal of Postharvest Technology*. 1(01): 36-51.
- Barea J. Ferrol, N. Azcón, C. Azcón, R. (2008). Mycorrhizal symbioses. In: *The Ecophysiology of Plant- Phosphorus Interactions*. 142-163 p. Philip, J. White. John, P. Hammond. Springer. 296 p.
- Barroso, C.D. Nahas, E. (2002). Solubilization of hardly soluble iron and aluminum phosphates by the fungus *Aspergillus niger* in the soil. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. *Developments in plant and Soil Sciences*. 102: 193-198.
- Beare M., Reddy M. Tian, G. Srivastava, S. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and Agroecosystem function in the tropics: the role of decomposer biota. *Applied Soil Ecology*. 6: 87-108
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia en Desarrollo*. 5(2): 145-154.
- Begonia, M. T. Begonia, G. B. Miller, G. Gilliard, D. Young, C. (2004). Phosphatase activity and populations of microorganisms from cadmium-and lead-contaminated soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 73(6): 1025-1032.
- Bills, G. Christensen, M. Powell, M. Thorn, G. (2004). 'Saprobic soil fungi', in G. M. Mueller, G. F. Bills y M. S. Foster (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Amsterdam. 271-302.
- Blakemore, L. C. (1981). Soil Bureau laboratory methods: A methods for chemical analysis of soils. *NZ Soil Bureau Scientific Report*. 10: 8-1.

- Bobadilla, H.C. Rincón, V.C.S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana. 75 p.
- Bonomelli, C. Bonilla, C. Valenzuela, A. (2003). Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa agropecuária brasileira bras.* 38(10): 1179-1186.
- Borges Chagas, L. F. Chagas Junior, A. F. Rodrigues de Carvalho, M. De Oliveira Miller, L. Colonia, O. (2015). Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma strains (Trichoplus JCO)* and effects on rice biomass. *Journal of soil science and plant nutrition.* 15(3): 794-804.
- Bray, R. Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science.* 59: 39-45.
- Bremner, J.M. (1965). Inorganic forms of nitrogen. *Agronomy.* 9(5): 179-237.
- Cantrell, I. Lingerman, R. (2001). Preinoculation of lettuce and onion with mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant Soil.* 233: 269-281.
- Cardenas, R. Sanchez, J. Farías, R. Peña, J. (2004). Los aportes de Nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 10(2): 173-178.
- Chakraborty, B. Chakraborty, U. Sha, A. Sunar, K. Dey, P. (2010). Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences.* 6(2): 195-200.
- Charest, C. Dalpe, Y. Brown, A. (1993). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and chilling on two hybrids of maize. *Mycorrhiza.* 4: 89-92
- Cisneros, C. A. Menjivar, J. C. (2016). Influencia de microorganismos solubilizadores de fósforo del suelo y su absorción por Plántulas de café. *Bioagro.* 28(2): 95-106.
- Clesceri, S. Greenberg, A. Trusell, R. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Díaz Santos. España. 4-187 p.
- Cubillos, J. R. Castellanos, D. E. Argüello, H. (2009). Selección de Microorganismos promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético) a partir de muestras de suelo rizosferico, como primera etapa en el desarrollo de un biofertilizante. *Revista Brasileira de Agroecologia.* 4(2): 1720- 1723.
- Cunningham, J. E. Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology.* 58(5): 1451-1458.

- Dash, S. Mahapatra, A.K. Gupta, N. (2013). Growth response of *Dalbergia sissoo* Roxb. To mineral solubilizing bacteria and fungi in nursery conditions. *Journal of Tropical Ecology*. 54: 109-115.
- De-Bashan, L. Hernandez, J. Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*. 61: 171-189.
- De Freitas, J. R., Banerjee, M. R. Germida, J. J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*. 24(4): 358-364
- Elías, F. Woyessa, D. Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International journal of microbiology*. 8 (10): 1-11.
- Fankem, H., Nwaga, D. Deubel, A. Dieng, L. Merbach, W. Etoa, F. X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*: 5(24): 2450- 2460.
- FAO. (2017). INFOODS Food Composition Database for Biodiversity, version 1.0. Disponible en línea: http://www.fao.org/infood/tables_int_en.stm. Consultado: 06/12/16.
- FAOSTAT. (2011). Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Food and Agricultural commodities production. Disponible en línea: http://faostat.fao.org/infoods/tables_int_en.stm. Consultado: 06/12/16.
- Fernández, M. Rodríguez, H. (2015). El papel de la solubilización del fósforo en los fertilizantes microbianos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 39(3): 27-34.
- Fernández, L. Zalba, P. Gómez, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *CI. Suelo (Argentina)*. 23(1): 31-37.
- Finlay, R. Soderstrom, B. (1992). Mycorrhiza and carbón flow to the soil. Allen MF. Dinamarca. 3ra edicion. 134-160 p.
- Funes, F. (2001). La agricultura cubana en camino a la sostenibilidad. *Leisa*. 7 (1): 21-23.
- García- López, A. M. Avilés Guerrero, M. Delgado García, A. (2015). Plant uptake of phosphorus from sparingly available P-sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. *Agricultural and Food Science*. 2015(24): 249-260.
- Galantini, J. A. Suñer, L. 2008. Las fracciones orgánicas del suelo: análisis en los suelos de la Argentina. *Agriscientia*. 25(1): 41-55.

- Gizaw, B. Tsegay, Z. Tefera, G. Aynalem, E. Wassie, M. Abatneh, E. (2017). Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from Teff rhizosphere soil collected from North Showa zone, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*. 11(17): 687-696.
- Gómez-Guiñán Y. Zabala M. (2001). Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del mani (*Arachis hypogaea* L.). *Saber Universidad de Oriente*. 13(1): 8-13.
- Goenadi, D. H. Siswanto, G. Sugiarto, Y. (2000). Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil science society of America journal*. 64(3): 927-932.
- Graham, J. Miller, R. (2005). Mycorrhizas: gene to function. *Plant and soil*. 274: 79-100.
- Gutiérrez Castorena, E. V. Gutiérrez Castorena, M. Ortiz Solorio, C. A. (2015). Manejo integrado de nutrientes en sistemas agrícolas intensivos: revisión. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 6(1): 201-215.
- Gyaneshwar, P. Kumar, N. Parekh, L. Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*. 245: 83-93.
- Hajjam, Y. Cherkaou, S. (2017). The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Materials*. 8(3): 801-808.
- Henríquez, M. Pérez, J. Gascó, J. M. Rodríguez, O. (2005). Determinación de la capacidad de intercambio catiónico en arena y caolín usando acetato de amonio, acetato de sodio y cloruro de amonio. *Bioagro*. 17(1): 59-62.
- Hernández-Leal, T. Carrión, G. Heredia, G. (2011). Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*. 45(8): 881-892.
- Hewitt, E. (1969). Sand and water culture methods used in the study of plants nutrition. Technical communication. Segunda edición. Inglaterra: Commonwealth Agricultural Bureaux. 73 p.
- Idriss, E. E. Makarewicz, O. Farouk, A. Rosner, K. Greiner, R. Bochow, H. Richer, T. Borris, R. (2002), Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth promoting effect. *Microbiology*. 148: 2097-2109.
- Illmer, P. Schinner, F. (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganism isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 24: 389-395.
- Illmer, P. Barbato, A. Schinner, F. (1994). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*. 27(3): 265-270.

- Jain, P. Sing, D. (2015). Study on the role of phosphate solubilizing fungi in phosphorus biavailability and growth enhancement of potato. *Chemical Science Review and Letters*. 4(13): 101-108.
- Jones, J. B. (1999). *Tomato Plant Culture*. CRC Press LLC. Florida U.S.A. 199 p.
- Kapri, A. Tewari, L. (2010). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(3): 787-795.
- Kaur, G. Reddy, M. (2004). Role of phosphate- solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 60(4): 549- 564.
- Khan, M. Khan, S. (2001). Biomangment of *fusarium* kilt of tomato by the soil application of certain phosphate solubilizing microorganisms. *International journal of pest management*. 47(3): 227-231.
- Khan, A. Jilani, G. Akhtar, S, Naqvi, S. Resheed. (2009). Phosphorus solubiling bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 1(1): 48- 58.
- Khan, M. Zaidi, A. Ahemad, M. Oves, M. Wani, P. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubiling fungi-current perspective. *Archives Agronomy Soil Science*. 56: 73-98.
- Kumar, M.V. Kumar, P. A. Sanjay, K. K. Pratap, S.B. (2014). Molecular characterization of phosphate solubilizing fungi associated with rhizosphere soils of banana. *Science Technology journal*. 2(1): 57-66.
- Küçük, Ç., Kivanç, M., Kinaci, E. Kinaci, G. (2008). Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. *Biologia*. 63(2): 167-170
- Lambers, H. Shane, M. W. Cramer, M. D. Pearse, S. J. Veneklaas, E. J. (2006). Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of botany*. 98(4): 693-713.
- Leal, D. Pico, Y. Castro, J. Guerra, J. Castro, G. (2011). Producción de ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. *Alimentos Hoy*. 19(19): 32-38.
- León, L. (1991). La experiencia del Centro Internacional para el Desarrollo de Fertilizantes en el uso de rocas fosfóricas en América Latina. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 17(1-4): 49-69.
- Lima-Rivera, D. L. Lopez-Lima, D. Desgarenes, D. Velázquez-Rodríguez, A. S. Carrion,

- G. (2016). Phosphate solubilization by fungi with nematicidal potential. *Journal of soil science and plant nutrition*. 16(2): 507-524.
- Machado, A. Q. Alvarenga, M. A. R. Florentino, C. E. T. (2007). Produção de tomate italiano (saladete) sob diferentes densidades de plantio e sistemas de poda visando ao consumo in natura Production of Italian tomato (saladete) in different plant densities and pruning systems aiming at in natura consumption. *Horticultura Brasileira*. 25(2): 149-153.
- Mackey, K. Paytan, A. (2009). Phosphorus cycle. Elsevier. 322- 334.
- Malviya, J. Singh, K. Joshi, V. (2011). Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of groundnut (*Arachis hypogaea*) plants. *Advances in Bioresearch*. 2: 110- 113.
- Mckean, S. (1993). Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías. 9-10 p.
- Mesa Garriga, L. González Suárez, E. de la Cruz, R. López, Y. (2005). Avances en la producción de ácido cítrico a partir de miel final por *aspergillus niger*. *Revista Cubana de Química*. 17(1): 171-178.
- Mittal, V. Singh, O. Nayyar, H. Kaur, J. Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*. 40(3): 718-727.
- Mohamed, Y. Ahmad, S. Osama, N. Siada, H. (2014). Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *Journal of Biology and Earth Sciences*. 4(1): 83-90.
- Mohan Singh, S. Sahab Yadav, L. Kumar Singh, S. Singh, P. Nath Singh, P. Ravindra, R. (2011). Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus niger* strains. *Polar Research*. 30(1): 72-83.
- Molina, M. Mahecha. L, Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 18(2): 164- 174.
- Morales, A. Alvear, M. Valenzuela, E. Castillo, C. E. Borie, F. (2011). Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilising fungi as potential biofertiliser. *Journal of soil science and plant nutrition*. 11(4): 89-103.
- Moratto, C. Martinez, L. Valencia, H. Sanchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*. 23(2): 299-309.

- Moreno Quevedo, A. P. Osorio Vega, N. W. Gonzalez Murillo, O. A. (2015). *In vitro* dissolution of acidulated rock phosphate by phosphate solubilizing microorganisms. *Acta Biológica Colombiana*. 20(2): 65-71.
- Moreno-Sarmiento, N. Moreno-Rodriguez, L.F. Uribe, D. (2007) Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. En: Izaguirre-Mayoral ML, Labandera-C, Sanjuan J (Eds.) Biofertilizantes en Iberoamerica: Visión técnica, científica y empresarial. Denad Internacional, Montevideo.1: 38-45 p.
- Morillo, A. Sequera, O. Ramírez, R. (2007). Roca fosfórica acidulada como fuente de fósforo en un suelo ácido con o sin encalado. *Bioagro*. 19(3): 161-168.
- Mueller, S. Wamser, A. F. (2009). Combinação da altura de desponte e do espaçamento entre plantas de tomate. *Horticultura Brasileira*, 27(1): 064-069.
- Murphy, J. Riley, J. (1962). Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27: 31-36.
- Narsian, V. Patel, H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*. 32(4): 559-565.
- Nebel, B. Wright, R. (1996). *Environmental Science: The Way the World Works*. Prentice Hall. Estados Unidos: 637 p.
- Noh-Medina, J. Boges, L. Soria, M. (2010). Composición nutrimental de biomasa y tejidos conductores en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12(2): 219-228.
- Nopparat, C. Jatupornpipat, M. Rittiboon, A. (2007). Isolation of phosphate solubilizing fungi in soil from Kanchanaburi, Thailand. *KMITL Science and Technology Journal*. 7: 137-146.
- Nunes Silva, G. Narloch, C. Scharf, R. (2002). Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(6): 847-854.
- Nur, I. Widiastuti, H. Joy, B. Antralina, M. (2015). Phosphate solubilizing microbe from saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. *Procedia Food Science*. 3: 426-435.
- Ñústez, C. E. Acevedo, J. C.. (2005). Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro). *Agronomía Colombiana*. 23(2): 290-298.
- Oberson, A. Joner, E.J. (2005). Microbial turnover of phosphorus in soil. En: Turner BL, Frossard E y Baldwin D (Eds.) *Organic phosphorus in the environment*. Suiza. 133-

164 p.

- Pandey, A. Das, N. Kumar, B. Rinu, K. Trivedi, P. (2008). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(1): 97-102.
- Paredes, M. Espinosa, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28(1): 61-70.
- Patil, P. M. Kuligod, V. B. Hebsur, N. S. Patil, C. R. Kulkarni, G. N. (2012). Effect of phosphate solubilizing fungi and phosphorus levels on growth, yield and nutrient content in maize (*Zea mays*). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*. 25(1): 58-62.
- Peix, A. Ribas, A. Mateos, P. Rodríguez, C. Martínez, E. Velazquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology Biochemistry*. 33(1): 103-110.
- Pérez, A. De la Ossa, J. Montes, D. (2012). Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 4(1): 35-45.
- Picone, L. Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informes Agronómicas del Cobi Sur*. 16: 11-15.
- Posada, R. De Prager, M. Sieverding, E. Dorantes, K. Abarca, G. (2012). Relaciones entre los hongos filamentosos y solubilizadores de fosfatos con algunas variables edáficas y el manejo de cafetales. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*. 60(3): 1075-1096.
- Pradhan, N. Sukla, L.B. (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*. 5(10): 850-854.
- Puente, M. García, J. Rubio, E. Peticari, A. (2010). Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. INTA–Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. *Publicación Miscelánea*. 116: 14-17.
- Pulido, M. A. Lobo-Luján, D. Lozano-Pérez, Z. (2009). Asociación entre indicadores de estabilidad estructural y la materia orgánica en suelos agrícolas de Venezuela. *Agrociencia*. 43(3): 221-230.
- Ramírez Gil, J. G. Osorno Bedoya, L. Osorio Vega, N. W. Morales Osorio, J. G. (2013). Alternativas microbiológicas para mejorar el crecimiento del caupí. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*. 66(2): 7035-7044.
- Ramírez Vargas, C. Nienhuis, J. (2012). Evaluación del crecimiento y productividad del

tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo cultivo protegido en tres localidades de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. 25(1): 3-15.

- Raigemborn, M. S. Krause, J. M. Bellosi, E. Matheos, S. D. (2010). Redefinición estratigráfica del grupo Río Chico (Paleógeno Inferior), en el norte de la cuenca del golfo San Jorge, Chubut. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*. 67(2): 239-256.
- Rathore, P. Phanse, N. Patel, B. (2014). Screening for microorganisms possessing phosphate solubilizing potential. *Indian Journal of Research*. 3(1): 172-174.
- Reddy, M. S. Kumar, S. Babita, K. Reddy, M. S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 84(2): 187-189.
- Reena. D.T. Deepthi, H. Pravitha, M.S. Lecturer, D. (2013). Isolation of phosphatesolubilizing bacteria and fungi from rhizospheres soil from banana plants and its effect on the growth of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*. 5: 6-11.
- Restrepo-Franco, G. Marulanda-Moreno, S. de la Fe-Pérez, Y. Díaz-de la Osa, A. Lucia-Baldani, V. Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 46 (1): 63-76.
- Reta, D. Cueta, J. Gaytán, M. Santamaría, C. (2007). Rendimiento y extracción de nitrógeno, fósforo y potasio de maíz forrajero en surcos estrechos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 33: 145-151.
- Reyes, I. Bernier, L. Simard, R. Tanguay, P. Antoun, H. (1998). Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 291-295.
- Reyes-Ocampo, F. Pérez-Pérez, E. Suárez-Hernández, J. González-Nodarse, J. F. (2017). Desempeño y balance económico-financiero de la producción de alimentos en una finca diversificada. *Pastos y Forrajes*. 39(1): 49-55.
- Richardson, A. Barea, J. McNeill, A. Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*. 321: 305-339.
- Richardson, A. E. Hadobas, P. A. Hayes, J. E. O'Hara, C. P. Simpson, R. J. (2011). Utilización de fósforo por las plantas de pasto suministrado con hexafosfato de mio-inositol se ve reforzada por la presencia de los microorganismos del suelo. *Plant Soil*. 229: 47-56.
- Ridge, E. H. Rovira, A. D. (1971). Phosphatase activity of intact young wheat roots under

- sterile and non-sterile conditions. *New Phytologist*. 70: 1017-1026.
- Roche, A. De Barac. (1959). Solubilization de phosphate natureles par les germes du sol. *Annales De I´Instut Pasteur*. 96: 781-789.
- Rodríguez, H. Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17(4): 319-339.
- Rodríguez, R. Tavares, R. Medina, S. (2001). Cultivo moderno del tomate. 2a Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España: 255 p.
- Romero, C. Alfonso, S. Medina, R. Flores, R. (2003). Evaluación inicial de la fertilización con roca fosfórica en tres especies del género *Brachiaria*. *Zootecnia Tropical*. 21(2): 183-196.
- Rooney, D. C. Clipson, N. J. (2009). Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microbial Ecology*. 57(1): 4-13.
- Ruiz-Lozano, J. Gómez, M. Azcón, R. (1995). Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological plant responses of lettuce to progressive drought stress. *Plant Science*. 110(1): 37-44.
- Samaniego, G. J. A. Ulloa, S. M. Herrera, S. T. (1988). Micobiota del suelo en huertas de nogal atacadas por *Phymatotrichum omnivorum*. *Revista Mexicana de Micología*. 4: 43-57.
- Samaniego, G. J. A. Chew-Madinaveitia, Y. (2007). Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78(2): 383-390
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2017). Monografía de cultivos “Jitomate”, Subsecretaria de Fomento a los agronegocios. 12 p. Disponible en línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>. Consultado: 12/12/16.
- Saxena, J. Saini, A. Ravi, I. Chandra, S. Garg, V. (2015). Consortium of phosphate solubilizing bacteria and fungi for promotion of growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum*). *Journal of crop improvement*. 29: 353-369.
- Sayer, J.A. Raggett, S.L. Gadd, G.M. (1995). Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Research*. 99(8): 987-993.
- Sediyama, M. A. N. Garcia, N. C. P. Vidigal, S. M. Matos, A. D. (2000). Nutrients in organic composts of plant residues and swine manure. *Scientia Agricola*. 57(1): 185-189.

- Selvi, K. B. Paul, J. J. A. Vijaya, V. Saraswathi, K. (2017). Analyzing the Efficacy of Phosphate Solubilizing Microorganisms by Enrichment Culture Techniques. *Biochemistry y Molecular Biology Journal*. 3(1): 7-1.
- Sharma, S. Sayyed, R. Trivedi, M. Gobi, T. (2013). Review Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer plus*. 2: 587.
- Shen, J. Yuan, J. Zhang, H. Bai, X. Chen, W. Zhang, W. Zhang, F. (2011). Update on phosphorus dynamics in the soil-plant continuum phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*. 156: 997- 1005.
- Shenoy, V. Kalagudi, G. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology advice*. 23: 501- 513.
- Sibi, G. (2011). Role of phosphate solubilizing fungi during phosphocompost production and their effect on the growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants. *Journal of Applied Physics*. 3(2): 287–290.
- SIAP, (2014). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo “Modalidad riego + temporal”. SAGARPA, D.F., México. Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx>. Consultado: 06/12/16.
- Silva Filho, G. Vidor, C. (2000). Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 24(2): 311-329.
- Silva Filho, G. Narloch, C. Scharf, R. (2002). solubilization of natural phosphates by microorganisms isolated from pinus and eucaliptos plantations in Santa Catalina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(6): 847- 854.
- Singh, H. Reddy, M.S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*. 47(1): 30-34.
- Singh, J. Pandey, V. Chandra P. Singh, D. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140: 339-353.
- Smil, V. (2000). Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. *Annual Review of Energy and the Environment*. 25: 53-88.
- Smith, S. E. Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd. Academic Press New York, ISBN. 4. 605 p.
- Souchie, E. Azcón, R. Barea, J. Saggin-Júnior, O. Da Silva, E. (2005). *Notas Científicas*

- Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. Pesquisa Agropecuária brasileira. 40(11): 1149-1152.
- Souchie, E. Azcón, R. Barea, J. Silva, E. Saggin-Júnior, O. (2010). Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(3): 771-777.
- Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research. 9(6): 778-781.
- StatSoft Inc. (2007). Statistica para Windows v. 8.0. Data analysis software system. Tulsa. [cd-Rom].
- Steiner, F. Lana, M. Zoz, T. (2016). Phosphate solubilizing fungi enhance the growth and phosphorus uptake of sorghum plants. Revista Brasileira de Milho e Sorgo. 15(1): 30-38.
- Stevenson, F. J. Cole, M.A. (1999). Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley y Sons, Nueva York, EE.UU. 2a. edición. 427 p.
- Sundara Rao, W. Sinha, M. K. (1963). Phosphate dissolving organisms in the soil and rhizosphere. Indian. Journal of Science. 33: 272-278.
- Swaby, R. J. Sperber, J. I. (1958). Phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere of legumes. Nutrition of the legumes (EG Hollworth, ed.): 289-294 p.
- Tapia, Y. García, F. (2013). La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica. Terra Latinoamericana. 31(3): 231-242.
- Tisdale, S. Nelson, W. Beaton. J. Havlin, J. (2004). Soil fertility and fertilizers. India. 7 Edición. 205 p.
- Torres, C. P. De Prager, M. S. (2014). Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento del ají (*Capsicum annum*). Acta Agronómica. 63(2): 136- 144.
- Vaidya, G. S. Shrestha, K. Khadge, B. R. Johnson, N. C. Wallander, H. (2008). Organic matter stimulates bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Bauhinia purpurea* and *Leucaena diversifolia* plantations on eroded slopes in Nepal. Restoration Ecology. 16(1): 79-87.
- Varsha, M. Nidhi, M. Anurag, M. 2010. Heavy metals in plants: phytoremediation: plants used to remediate heavy metal pollution. Agriculture and Biology Journal of North America. 1(1): 40-46.
- Vassilev, N. Franco, I. Vassileva, M. Azcon, R. (1996). Improved plant growth with rock

- phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste. *Bioresource Technology*. 55(3): 237-241.
- Velásquez, J. Beltrán, F. D., Padilla, L. Giraldo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *Aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (*musa aab simmonds*) maduro. *Tumbaga*. 1(5): 135-147.
- Velázquez, M. S. Cabello, M. N. Elíades, L. A. Russo, M. L. Allegrucci, N. Schalamuk, S. (2017). Combinación de hongos movilizadores y solubilizadores de fósforo con rocas fosfóricas y materiales volcánicos para la promoción del crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista Argentina de Microbiología*. 49(4): 347-355.
- Vera, D. H. Herando P. Herando V. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, *Myrtaceae*). *Acta biológica Colombiana*. 7(1): 33-40.
- Verma, A. Ekka, A. (2015). Isolation, screening and assessment of phosphate solubilizing efficiency of some fungal isolates of Raipur, Chhattisgarh. *Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology*. 1(1): 29-39.
- Villarreal, G. Alfaro, E. (1997). *Manual internacional de fertilidad de suelos*. Potash y Phosphate Institute. 145 p.
- Vitorino, L. Silva, F. Soares, M. Souchie, E. Costa, A. Lima, W. (2012). Solubilization of calcium and iron phosphate and *in vitro* production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marruboides* Epling (*Lamiaceae*). *International Research Journal of Biotechnology*. 3(4): 47-54.
- Walker, T.W. Syers, J.K. (1976). The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma* 15(1): 1-19.
- Walkley, A. Black, I. A. (1934). An examination of the Degjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29-38.
- Whitelaw, S. McKeown, K. Williams, J. (1997). Global health promotion models: enlightenment or entrapment?. *Health education research*. 12(4): 479-490.
- Zeroual, Y. Chadghan, R. Hakam, A. Kossir, A. (2012). Biosolubilization of mineral insoluble phosphates by immobilized fungi (*Aspergillus niger*) in fluidized bed bioreactor. *Journal of Biotechnology y Biomaterials*. 6: 1-5.

Anexos

Anexo 1. Elaboración del medio de Sundara (Sundara y Sinha, 1923)

Reactivos para la elaboración del medio de cultivo revelador con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

| Reactivos | 1 L (g) | ¼ L (g) |
|----------------------|---------|---------|
| Cloruro de Potasio | 0.2 | 0.05 |
| Sulfato de Amonio | 0.5 | 0.125 |
| Sulfato de Magnesio | 0.3 | 0.075 |
| Sulfato de Manganeso | 0.004 | 0.001 |
| Cloruro de Sodio | 0.2 | 0.05 |
| Glucosa | 10 | 2.5 |
| Levadura | 0.5 | 0.125 |
| Clorofenicol | 0.1 | 0.025 |
| Agar | 18 | 4.5 |
| Sulfato de Fierro | 0.002 | 0.0005 |

Preparar por separado:

| | | |
|---------------|-----|-------|
| Goma Arábica | 0.5 | 0.125 |
| P de Calcio | 0.5 | 0.125 |
| P de Hierro | 0.5 | 0.125 |
| P de Aluminio | 0.5 | 0.125 |

Nota: Las cantidades ya mencionadas corresponden según lo que se quiera preparar

Anexo 2. Determinación de fósforo soluble con el método de reducción del ácido ascórbico

Curva de calibración:

Se disuelve 5 mL de la solución de fosfato monopotásico (a una concentración de 50 mg/L) en 500 mL de agua destilada, posteriormente se toman las siguientes cantidades para obtener las concentraciones indicadas en la siguiente cuadro:

| mL de sol/ 1 mg | Concentraciones |
|-----------------|-----------------|
| 1 | 0.02 |
| 3 | 0.06 |
| 5 | 0.10 |
| 10 | 0.20 |
| 20 | 0.40 |
| 30 | 0.6 |

Seguido se aforan a 50 mL con agua destilada en matraces volumétricos, se agitan durante 15 segundos y de cada una de las muestras se toman 10 mL. Se le agregan 2 mL de reactivo combinado, se agitan en vortex durante 10 segundos y se dejan reposar durante 20 minutos. Finalmente se efectúan las lecturas en el espectrofotómetro (esta reacción tiene una estabilidad de hasta 24 horas de confianza).

Preparación de los reactivos:

Reactivo combinado

| Reactivo | 300 mL | 200 mL | 150 mL | 50 mL | 25 mL |
|--|--------|--------|--------|-------|-------|
| Ácido sulfurico 5N (mL) | 150 | 100 | 75 | 25 | 12.5 |
| Tartrato de antimonio (mL) | 15 | 10 | 7.5 | 2.5 | 1.25 |
| Molibdato de amonio (mL) | 45 | 30 | 22.5 | 7.5 | 3.75 |
| Ácido ascórbico (Disolver en agua destilada) (g) | 1.584 | 1.056 | .792 | .264 | .132 |
| Agua destilada (mL) | 90 | 60 | 45 | 15 | 7.5 |

Nota: Los reactivos mencionados deben de agregarse en ese orden, de lo contrario no se llevará a cabo la reacción.

Cuadro 7. Métodos de preparación de los reactivos

| | |
|-----------------------|--|
| Acido sulfúrico | En 600 mL de agua destilada se agregan 140 mL de H ₂ SO ₄ concentrado y se afora a 1 L. |
| Tartrato de antimonio | Se disuelven 3 g de (NH ₄) ₃ C ₄ H ₄ O ₆ en 50 mL de agua destilada, posteriormente se aforan a 100 mL |
| Molibdato de amonio | Disolver 4 g de (NH ₄) ₂ MoO ₄ en 100 mL de agua destilada. |
| Ácido ascórbico | Se disuelve la cantidad a utilizar en agua destilada hasta que desaparezcan los gránulos (este reactivo se prepara al momento de utilizarse) |

Anexo 3. Elaboración de la solución nutritiva de Hewitt (1969)

Es indispensable la elaboración de una solución madre y a partir de esta tomar las cantidades correspondientes para preparar 1 o 5 litros de solución, la cual se elabora de la siguiente forma:

| Reactivos | Solución madre gr/100 mL | Para 1 L de solución nutritiva (mL) | Para 5 L de solución nutritiva (ml) |
|---|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| 1. Nitrato de Potasio NO_3K | 3.03 | 10 | 50 |
| 2. Nitrato de Calcio $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ | 7.08 | 20 | 100 |
| 3. Sulfato de Magnesio $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.84 | 20 | 100 |
| 4. EDTA Fe (II) | 0.25 | 10 | 50 |
| 5. Sulfato de Manganeso $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0.22 | 1 | 5 |
| 6. Sulfato de Cobre $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0.24 | 0.1 | 0.5 |
| 7. Sulfato de Zinc $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0.29 | 0.1 | 0.5 |
| 8. Ácido Bórico BO_3H_3 | 1.86 | 0.1 | 0.5 |
| 9. Molibdato de Amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo} \cdot 7\text{O}_24$ | 0.03 | 0.1 | 0.5 |

Nota: Las cantidades ya mencionadas se aforan de 1 L o 5 L según lo que se quiera prepara

Anexo 4. Determinación del fósforo soluble en el sustrato: Método Bray y Kurtz, (1945)

Preparación de los reactivos y curva de calibración.

Solución extractante de Bray y Kurtz (floruro de amonio 0.03 N y ácido clorhídrico 0.025 N): Se disuelven 1.11 g de floruro de amonio en agua destilada. Se diluyen a 900 mL y se adicionan 2 mL de HCL concentrado (pureza 37.23 %).

Ácido Sulfúrico 14 N: Se diluyen 196 mL de ácido sulfúrico concentrado en agua destilada y se aforan a 500 mL (el ácido debe de agregarse al agua).

Tartrato de antimonio y potasio 0.5 %: se disuelven 0.5 g de tartrato de antimonio y potasio en 100 mL de agua destilada.

Solución Stock: Se disuelven 10 g de molibdato de amonio en 150 mL de agua destilada. Se agregan lentamente 225 mL de ácido sulfúrico 14 N y 50 mL de tartrato de amonio y potasio al 0.5 %. Se aforan a 500 mL con agua destilada (es recomendable que se guarde en frasco ambar).

Reactivo combinado: Se adicionan 1.5 g de L-ácido ascórbico a 100 mL de la solución stock (este reactivo debe de prepararse a la hora de utilizar).

Estándar de P de 200 ppm: Se disuelven 0.8786 g de fosfato de dihidrógeno de potasio en 1 L de agua destilada (debe de ser guardado en frascos de plásticos y conservar a 4 °C).

Estándar de P 2.5 ppm: Se diluyen 12.5 mL de la solución de 200 ppm de P y se afora a 1 L con agua destilada (A partir de esta solución se toman las alícuotas para la curva de calibración).

| Estándar de P 2.5 ppm* | Solución extractante** | Reactivo combinado | Agua destilada*** | Concentración de P ppm |
|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| mL | | | | |
| 0 | 5 | 5 | 40 | 0 |
| 1 | 5 | 5 | 40 | .05 |
| 2 | 5 | 5 | 40 | .10 |
| 4 | 5 | 5 | 40 | .20 |
| 8 | 5 | 5 | 40 | .40 |
| 12 | 5 | 5 | 40 | .60 |

*Debe de realizarse en matraz volumétrico de 50 mL.

**Las alícuotas de 5 y 10 son las más adecuadas para suelos con bajos contenidos de P.

***Esta cantidad puede variar según el contenido de la alícuota que se tome (5 o 10 mL).

Para calcular la cantidad de fósforo soluble en el sustrato se utilizó la siguiente fórmula:

$$P \left(\frac{mg}{kg} \right) = ppm \text{ en CC} \times DM \times DV$$

donde:

ppm en CC: partes por millón en la curva de calibración

DM: dilución masa (volumen de la solución extractante)/(gramos de muestra)

DV: dilución del volumen (aforo)/(alícuota de muestra agregada)

Anexo 5. Cuantificación del fósforo total de la parte aérea

Reactivos:

Solución desarrolladora de color: Se toman 25 ml de la solución A y se agregan 800 ml de agua destilada, mezclar bien. Añadir 10 ml de la solución B, aforar a 1 L.

Solución A: Disolver 60 gr de molibdato de amonio en 200 ml de agua, añadir 1.455 gr de tartrato de antimonio y potasio, posteriormente agregar lentamente y con agitación suave 700 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%). Cuando la solución se enfríe aforar a 1 L con agua destilada.

Solución B: Disolver 13.2 g de ácido ascórbico en 100 ml de agua destilada.

Ácido clorhídrico 0.3 M: Tomar 24.83 ml de HCl concentrado (37%) y aforar a 1L con agua destilada.

Estándar de P 50 mg/L: Disolver 0.05 gr de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) en 1 L de agua destilada. Almacenar en frasco de vidrio y conservar a 4 °C. A partir de esta solución se toman las siguientes alícuotas para la curva de calibración (Cuadro 8)

Cuadro 8. Descripción de las diferentes concentraciones de fósforo, en la curva de calibración.

| Estándar de P (50mg L ⁻¹) ml | Agua destilada ml | Concentración mg L ⁻¹ |
|---|-------------------|----------------------------------|
| 1 | 49 | 1 |
| 2 | 48 | 2 |
| 4 | 46 | 4 |
| 6 | 44 | 6 |
| 8 | 42 | 8 |
| 10 | 40 | 10 |
| 12 | 38 | 12 |
| 14 | 36 | 14 |
| 16 | 34 | 16 |

Debe realizarse en matraz volumétrico de 50 ml.

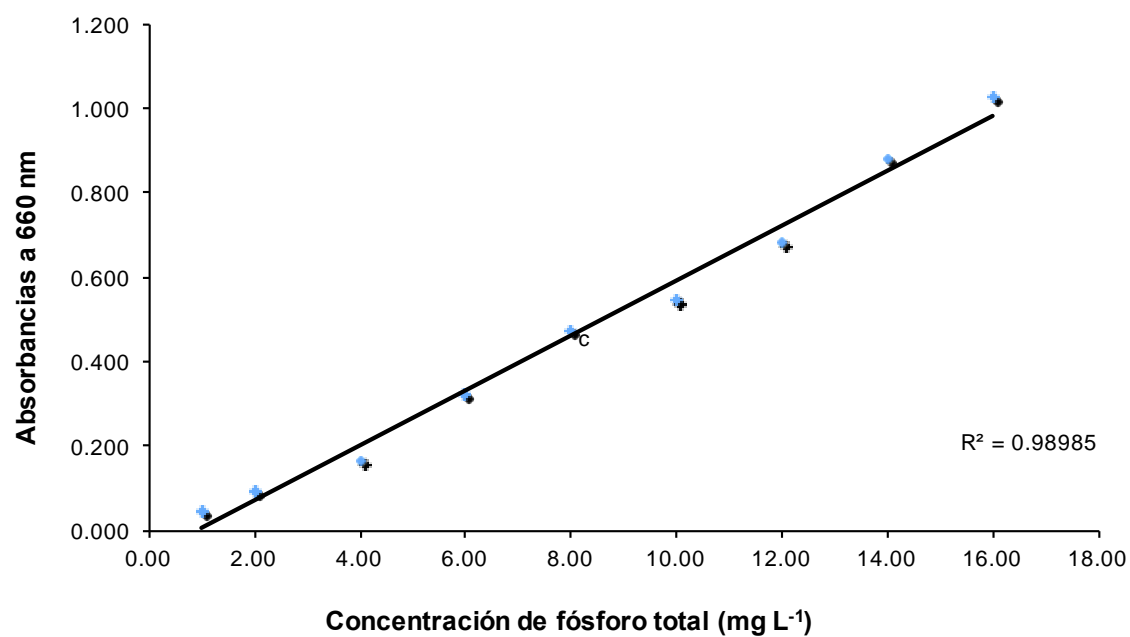


Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación del fósforo total de la parte área, medida a 660 nm.