



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

Evaluación de la inoculación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), variedad I-481 Rojo del valle

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA AGROPECUARIA

**LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: GESTIÓN SOSTENIBLE Y APROVECHAMIENTO DE
LOS RECURSOS NATURALES.**

SUBLINEA: DESARROLLO Y SOSTENIBILIDAD.

AUTOR: JOHANNA LIZBETH CUATÍN RUANO

ASESOR: MSc. LENNYS BEATRIZ BERUTTI SUAREZ

Ibarra, 04 de mayo del 2023

Ibarra, 04 de mayo del 2023

MSc. Lennys Beatriz Berutti Suarez

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigente en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



(f)

MSc. Lennys Beatriz Berutti Suarez

C.C.: 1757289986

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):



f):

MSc. Lennys Beatriz Berutti Suarez

C.C.: 1757289986



f):

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399



f):

PhD. Yadira Fernanda Ordoñez Vivanco

C.C.: 1103764864

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Johanna Lizbeth Cuatín Ruano, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 de Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derecho de disponer de sus derechos o autorizar de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 04 de mayo del 2023



f):

Johanna Lizbeth Cuatín Ruano

C.C.: 1004786206

AUTORÍA

Yo, Johanna Lizbeth Cuatín Ruano, portador de la cédula de ciudadanía N° 1004786206, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



f)

Johanna Lizbeth Cuatín Ruano

C.C.: 1004786206

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Johanna Lizbeth Cuatín Ruano, con C.C.: 1004786206, autor del trabajo de grado intitulado: "Evaluación de la inoculación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), variedad I-481 Rojo del valle " previo a la obtención del título profesional de Ingeniería Agropecuaria, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 04 de mayo del 2023



f):

Johanna Lizbeth Cuatín Ruano

C.C.: 1004786206

DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación de Proyecto de Titulación "Evaluación de la inoculación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), variedad I-481 Rojo del valle ", lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 10 de febrero del 2022

Para constancia firma:



f):

Johanna Lizbeth Cuatín Ruano

C.C/ Pasaporte: 1004786206

Carrera: Ingeniería Agropecuaria

Ibarra, 04 de mayo del 2023

DEDICATORIA

Dedico de forma muy especial la presente investigación y esfuerzo, con mucho cariño a Dios por darme la vida y todo lo que tengo, por llenarme de bendiciones día tras día y en especial por la bendición de poder contar con una familia, por proveerme de fortaleza para seguir adelante cuando sentí querer renunciar ante las dificultades, por permitirme conocer personas maravillosas de las que siempre he tenido algo importante que aprender y, por concederme el don del entendimiento y la sabiduría que me han permitido llegar hasta donde estoy.

A mi padre Joselito Cuatín y a mi madre Maura Ruano por todos los sacrificios que han hecho día a día por ofrecerme a mí y a mis hermanos una vida mejor, por sus enseñanzas, su apoyo incondicional, orientación y, crianza llena de amor, así como también de valores que hoy por hoy hacen de mí la persona que soy.

A mi hermano mayor Anderson Cuatín por ser desde nuestra niñez un gran ejemplo de responsabilidad, compromiso, trabajo y por enseñarme que un sueño no se cumple con tan solo pensarlo, sino que hay que actuar y ser constante hasta alcanzarlos. A mi hermano menor Stalin Cuatín por su cariño, su compañía y por todos los momentos donde las risas no faltaron.

A mis difuntos abuelitos que fueron mis segundos padres quienes siempre me llenaron de un amor tierno y por todos los consejos que se quedaron grabados en mi memoria.

A mis compañeros y compañeras de salón que se fueron convirtiendo poco a poco en mi segunda familia y con quiénes compartimos momentos bonitos dentro y fuera del salón de clases. A mi gran amiga Joselyn Anrango por creer siempre en mí aun cuando ni yo misma me sentía capaz, por estar dispuesta a escucharme sin importar nada y por brindarme su generosa amistad durante este largo recorrido en la universidad.

Johanna Lizbeth Cuatín Ruano

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi eterno agradecimiento en primer lugar a Dios por darme la oportunidad de continuar mis estudios de tercer nivel para formarme como una gran profesional y por permitirme culminar esta etapa universitaria de la mejor manera posible para comenzar una nueva.

Agradezco a mis padres por ser mi soporte en los momentos difíciles, por ayudarme de una u otra manera aun cuando había situaciones complejas en casa, por inculcarme el valor del trabajo y la perseverancia, los dos valores más importantes que me han permitido avanzar en este arduo camino hasta alcanzar mi sueño de convertirme en una profesional.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por su acogida y por permitirme ser parte de esta prestigiosa institución en la cual he podido instruirme en el campo de la ingeniería agropecuaria con los mejores maestros.

A todos mis profesores que durante todo este tiempo han compartido sus conocimientos en cada clase y que han sido útiles para la ejecución de este trabajo de tesis. A todos los maestros que dentro o fuera del salón de clases nos han brindado grandes consejos y sermones para afrontar el mundo laboral y, para ser mejores no solo como profesionales sino también como personas.

A la Mgs. Lennys Berutti por su paciencia, asesoramiento e instrucción para poder llevar a cabo este trabajo investigativo, al Mgs Santiago Mafla por estar dispuesto a despejar cualquier duda que se presentaba en la parte práctica de esta tesis y al PhD Diego León por darnos las pautas necesarias en la materia de titulación para la ejecución de la tesis.

De forma muy especial a mi querida amiga Joselyn Anrango por su acompañamiento y apoyo incondicional de principio a fin durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Johanna Lizbeth Cuatín Ruano

ÍNDICE

RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
2.3. Hipótesis	3
CAPÍTULO III	4
ESTADO DEL ARTE	4
3.1. Importancia del fósforo en la agricultura	4
3.1.1. Fertilizantes fosforados químicos.....	4
3.1.2. Fuentes de fósforo a nivel mundial.....	5
3.1.3. Importancia de fósforo en los cultivos	6
3.1.4. Fósforo en el suelo.....	7
3.1.3.1. Formas de fósforo en el suelo.....	7
3.1.3.2. Ciclo del fósforo	9
3.1.3.3. Retención o fijación de fósforo en la superficie del suelo.....	9
3.2. Microorganismos solubilizadores de fósforo	10
3.2.1. Hongos solubilizadores de fósforo	12
3.2.2. Mecanismos de solubilización de fosfatos	14
3.2.3. Inoculaciones de hongos solubilizadores de fósforo en cultivos.....	14
3.2.4. <i>Aspergillus niger</i>	16

3.3. Biofertilizantes	17
3.3.1. Momentos ideales para la biofertilización fosfórica.....	18
3.4. Cultivo de fréjol.....	18
3.4.1. Origen	19
3.4.2. Cultivo de fréjol en el Ecuador.....	19
3.4.3. Taxonomía	20
3.4.4. Descripción de la variedad Rojo del valle o INIAP 481	20
3.4.5. Distribución y adaptación.....	22
CAPÍTULO IV	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. Materiales	23
4.2. Métodos	25
4.2.1. Ubicación del experimento.....	25
4.2.2. Características agroclimáticas del sitio experimental.....	26
4.2.3. Análisis estadístico	27
4.2.4. Diseño experimental.....	27
4.2.5. Unidad experimental.....	28
4.2.6. Parcela neta.....	28
4.2.7. Factores en estudio	29
4.2.8. Tratamientos	29
4.2.9. Variables	30
4.2.9.1. Variables independientes.....	30
4.2.9.2. Variables dependientes	31
4.2.10. Alcance del primer objetivo específico	32
4.2.10.1. Reactivación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	32

4.2.10.2. Identificación macroscópica y microscópica.....	33
4.2.10.3. Evaluación cualitativa de solubilización de fósforo por la cepa	33
4.2.10.4. Preparación de los inóculos fúngicos	34
4.2.10.5. Adecuación del espacio en el invernadero para el cultivo.....	35
4.2.10.6. Recolección, preparación del suelo y llenado de bolsas.....	35
4.2.10.7. Selección de semillas.....	36
4.2.10.8. Desinfección de semillas	36
4.2.10.9. Inoculación fúngica	37
4.2.10.10. Labores culturales en el cultivo de fréjol.....	37
4.2.10.11. Evaluación de las variables agronómicas	38
4.2.11. Alcance del segundo objetivo específico.....	39
4.2.11.1. Análisis de suelo inicial.....	39
4.2.11.2. Análisis de suelo final.....	40
4.2.11.3. Monitoreo de la presencia del HSP en los tratamientos	40
CAPÍTULO V	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1. Reactivación e identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	41
5.2. Evaluación de la eficiencia e índice de solubilización de fósforo <i>in vitro</i>	42
5.3. Evaluación de las variables dependientes.....	44
5.3.1. Rendimiento	46
5.3.2. Número de vainas por planta.....	50
5.3.3. Números de granos por vaina	54
5.3.4. Longitud de la raíz.....	56
5.3.5. Fósforo disponible de los tratamientos.....	60
CAPÍTULO VI	63

CONCLUSIONES.....	63
CAPÍTULO VII.....	64
RECOMENDACIONES	64
CAPÍTULO VIII	65
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas de fósforo inorgánico presente en el suelo	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica del cultivo de fréjol	20
Tabla 3. Caracterización morfológica del fréjol INIAP 481 “Rojo del valle”	21
Tabla 4. Características agronómicas fréjol INIAP 481 “Rojo del valle”	22
Tabla 5. Ubicación geográfica del sitio experimental	25
Tabla 6. Condiciones agroclimáticas del invernadero o sitio experimental	26
Tabla 7. Esquema de análisis ADEVA	27
Tabla 8. Factores de estudio y niveles	29
Tabla 9. Esquema de los tratamientos aplicados en la investigación	30
Tabla 10. Recomendación de fertilización de fréjol arbustivo.	38
Tabla 11. Promedio del IS y % ES del hongo a los 3 y 5 días de cultivo.....	43
Tabla 12. Pruebas de normalidad y homogeneidad para las variables dependientes.	45
Tabla 13. Análisis de varianza para la variable rendimiento.	46
Tabla 14. Análisis de varianza para la variable número de vainas por planta.	51
Tabla 15. Análisis de varianza para la variable longitud de raíz.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonificación del invernadero de la granja experimental ECAA	26
Figura 2. Distribución de las unidades experimentales en el ensayo.....	28
Figura 3. Identificación del hongo reactivado en PDA	41
Figura 4. Actividad solubilizadora del hongo en el medio de cultivo Pikovskaya.....	42
Figura 5. Prueba de Tukey al 5% para la variable rendimiento.....	47
Figura 6. Prueba de Tukey al 5 % para el rendimiento en relación al momento de inoculación.....	48
Figura 7. Promedios para rendimientos en relación a la dosis del inóculo fúngico	49
Figura 8. Prueba de Tukey al 5 % para la variable vainas por planta.....	52
Figura 9. Prueba de Tukey al 5 % para el número de vainas en relación al momento de inoculación.....	53
Figura 10. Promedios para el número de vainas en relación a la dosis del inóculo	53
Figura 11. Comparación del número de granos por vaina obtenidos en los distintos tratamientos.....	55
Figura 12. Prueba de Tukey al 5 % para la variable longitud de la raíz.....	57
Figura 13. Prueba de Tukey al 5 % para la longitud de la raíz en relación al momento de inoculación.....	58
Figura 14. Comparación de la longitud de la raíz en relación a la dosis del inóculo.	59
Figura 15. Fósforo disponible inicial y en el suelo rizosférico de los tratamientos al final del cultivo.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espacio para el ensayo en la granja experimental ECAA.....	74
Anexo 2. Reactivación y crecimiento del hongo en medio de cultivo PDA.	74
Anexo 3. Observación del hongo bajo microscopio compuesto con lente 40x.	75
Anexo 4. Medio de cultivo Agar Pikovskaya Modificado.	75
Anexo 5. Prueba de solubilización de fósforo In vitro.	76
Anexo 6. Preparación del inóculo y de la suspensión de goma arábica más azúcar	76
Anexo 7. Recolección del suelo en una parcela del cantón San Pedro de Huaca.....	77
Anexo 8. Secado, tamizado del suelo recolectado y llenado de bolsas.	78
Anexo 9. Selección y desinfección de semilla certificada I-481 Rojo del Valle.....	79
Anexo 10. Inoculación del <i>Aspergillus niger</i> P., a la siembra, 15 días y 45 días.....	79
Anexo 11. Labores culturales realizadas durante el ciclo del cultivo de fréjol.	80
Anexo 12. Proceso de destilación y esterilización a 121 °C del agua para riego.	81
Anexo 13. Muestreo de suelo en la parcela de pasto y análisis químico inicial.....	82
Anexo 14. Muestras de suelo rizosférico de los tratamientos y análisis químico final	83
Anexo 15. Evaluación del cultivo de fréjol.	84
Anexo 16. Cultivo de fréjol 15 días después de la siembra.	85
Anexo 17. Estado del cultivo previo a la floración.....	86
Anexo 18. Cultivo de fréjol en floración.	87
Anexo 19. Formación y llenado de vaina.	88
Anexo 20. Cultivo de fréjol a los 100 días del cultivo.	88
Anexo 21. Proceso de monitoreo de la presencia del hongo inoculado	89
Anexo 22. Base de datos de la investigación.....	90

RESUMEN

Las deficiencias de fósforo en los cultivos agrícolas comúnmente son suplidas por los agricultores mediante aplicaciones de fertilizantes fosforados de síntesis química. Sin embargo, estas prácticas afectan significativamente el medio ambiente y la salud del suelo cuando se emplean de forma inadecuada o en cantidades excesivas. Ante esto, el uso de biofertilizantes a base de microorganismos solubilizadores de fósforo, constituyen una alternativa sostenible, al aumentar la disponibilidad de este nutriente al solubilizar grandes reservas de fósforo insoluble que se encuentran en muchos suelos, resultado de la fijación de gran parte de los fertilizantes aplicados, los cuales al no ser asimilados correctamente por los cultivos se ven afectados distintos procesos en el desarrollo y la producción. En la presente investigación se llevó a cabo el experimento tanto en laboratorio como en invernadero. En laboratorio se realizó la reactivación de la cepa fúngica de *Aspergillus niger* P., como hongo solubilizador de fósforo, se evaluó cualitativamente la capacidad de solubilización de esta cepa por la presencia de halos translúcidos en el medio de cultivo pikovskaya modificado, y se preparó el inóculo fúngico en tres concentraciones distintas, mismas que fueron probadas en tres momentos diferentes (en la siembra, 15 días después de la siembra y previo a la floración) del ciclo fenológico del cultivo de frejol de la variedad I -481 Rojo del valle, el cual fue establecido en invernadero. Después de 100 días de cultivo, se analizó algunas variables agronómicas como rendimiento, número de vainas por planta, números de granos por vaina y longitud de la raíz, además se cuantificó el fósforo disponible del suelo de cada uno de los tratamientos. Al analizar los datos, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0,05$) para las variables de rendimiento, número de vainas, y longitud de la raíz. Los resultados mostraron que en el cultivo de fréjol, la fertilización química fue el mejor tratamiento con el cual se obtuvo un rendimiento de 1003 kg/ha, mientras que la inoculación del hongo *Aspergillus niger* P., causó efectos positivos especialmente cuando fueron inoculados previo a la floración a una concentración de 1×10^9 UFC/ml, con lo cual se obtuvo un rendimiento de 992,59 kg/ha, mismo que se le atribuye al aumento de la disponibilidad de fósforo en la rizósfera lo cual se evidenció mediante los análisis de suelo.

Palabras clave: Microorganismos solubilizadores de fósforo, *Aspergillus niger* P., inóculo fúngico, biofertilizante.

ABSTRACT

Phosphorus deficiencies in agricultural crops are commonly supplied by farmers through applications of chemically synthesized phosphorus fertilizers. However, these practices significantly affect the environment and soil health when used improperly or in excessive amounts. Given this, the use of biofertilizers based on phosphorus solubilizing microorganisms constitutes a sustainable alternative, by increasing the availability of this nutrient by solubilizing large reserves of insoluble phosphorus found in many soils, the result of the fixation of a large part of the applied fertilizers, which, by not being correctly assimilated by the crops, different processes in development and production are affected. In the present investigation, the experiment was carried out both in the laboratory and in the greenhouse. In the laboratory, the reactivation of the fungal strain of *Aspergillus niger* P. was carried out, as a phosphorus solubilizing fungus, the solubilization capacity of this strain was qualitatively evaluated by the presence of translucent halos in the modified pikovskaya culture medium, and the fungal inoculum in three different concentrations, which were tested at three different moments (at sowing, 15 days after sowing and prior to flowering) of the phenological cycle of the bean crop of the variety I -481 Rojo del valle, el which was established in greenhouse. After 100 days of cultivation, some agronomic variables such as yield, number of pods per plant, number of grains per pod and root length were analyzed, and the available phosphorus from the soil of each of the treatments was quantified. When analyzing the data, significant differences were found between the treatments ($P \leq 0.05$) for the variables of yield, number of pods, and root length. The results showed that in the bean crop, chemical fertilization was the best treatment with which a yield of 1003 kg/ha was obtained, while the inoculation of the *Aspergillus niger* P. fungus caused positive effects, especially when they were inoculated prior to flowering at a concentration of 1×10^9 CFU/ml, with which a yield of 992.59 kg/ha was obtained, which is attributed to the increase in the availability of phosphorus in the rhizosphere, which was evidenced by soil analysis.

Key words: Phosphorus solubilizing microorganisms, *Aspergillus niger* P., fungal inoculum, biofertilizer.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas la población mundial ha ido creciendo paulatinamente, de modo que a mediados del 2019 alcanzó los 7.700 millones de habitantes, mientras que para el año 2050 se estima que la población puede alcanzar los 10.100 millones (United Nations, 2019). Ante este crecimiento, se considera que se requiere un aumento de un 70% en la producción agroalimentaria (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2018). Por lo tanto, para satisfacer esta demanda alimentaria, la agricultura moderna se ha enfocado en incrementar los rendimientos de los cultivos mediante el uso de diferentes insumos agroquímicos, en especial de fertilizantes que contienen altas cantidades de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio (Alburquerque y Velásquez, 2008; Sotelo et al., 2020). Esta práctica ha mostrado ser muy exitosa al mejorar los rendimientos agronómicos pero es altamente contaminante dado que los fertilizantes al ser deficientemente asimilados por los cultivos ocasionan la pérdida de la diversidad biológica, disminución de los recursos forestales, provocan la erosión del suelo y por ende reducen las superficies apropiadas para la agricultura (Grageda et al., 2012).

En relación a los fertilizantes fosforados, estos han sido considerados muy importantes en la agricultura, dado que el fósforo es un macronutriente fundamental para las plantas, considerado como el segundo elemento más importante después del nitrógeno en la nutrición de los cultivos (Lozano et al., 2012). Debido a que las plantas no tienen la capacidad de sintetizar este nutriente y en el suelo se encuentra en cantidades insuficientes ya que la mayor parte de fósforo se halla en formas insolubles, los agricultores generalmente recurren a los fertilizantes químicos para suplir los requerimientos de las plantas (Corrales et al., 2014; Restrepo et al., 2017). Sin embargo, cerca del 80% de fósforo aplicado como fertilizantes forma rápidamente compuestos insolubles al establecer enlaces con iones metálicos de aluminio, hierro, calcio y magnesio. Por lo tanto, gran cantidad de estos productos aplicados no son aprovechados por los vegetales, sino que tienden a almacenarse en el suelo (Pérez et al., 2012; Acosta et al., 2019). Además, teniendo en cuenta que estos insumos en ocasiones son usados sin considerar las condiciones óptimas para su aplicación como las características del suelo y tipo de cultivo, su uso desmedido a más de incrementar los costos de producción,

conducen a riesgos de contaminación ambiental por su lixiviación hacia aguas subterráneas y degradación de los suelos por exceso de salinidad (Corrales et al., 2014; Romero et al., 2019). Sumado a esto, el incremento de la producción de fertilizantes fosforados, está ocasionando de forma acelerada, el agotamiento de las reservas de roca fosfórica, mismas que se califican cómo recursos no renovables (Albuquerque et al., 2008; Lozano 2012).

Por todo lo mencionado, en la actualidad con el fin de reducir el uso de los fertilizantes químicos, se está imponiendo en la agricultura mundial prácticas sostenibles que ayuden a preservar los recursos edáficos y ambientales, mediante, la selección de cultivos más eficientes o bien con la implementación de estrategias que ayuden a optimizar la biodisponibilidad del fósforo en el suelo (Lozano, 2012). Una alternativa ecológicamente aceptable, es el uso de enmiendas microbianas (o biofertilizantes) que se producen a partir de microorganismos debidamente seleccionados con diferentes capacidades de promover el crecimiento vegetal y disolver las reservas de fósforo insoluble del suelo (Beltrán, 2014; Romero, 2018). Entre estos microorganismos benéficos se encuentran los hongos solubilizadores de fósforo (HSP), los cuales juegan un rol primordial en el ciclaje de este nutriente en los suelos, ya que tienen la habilidad de convertir el fósforo orgánico e inorgánico, en fósforo soluble y disponible para las plantas (Romero, 2018). Sin embargo, si bien actualmente este tipo de enmiendas microbianas se emplean exitosamente en diversos países desarrollados, en los países que se encuentran en desarrollo su uso y aprobación se encuentra limitada por distintos factores, entre estos el escaso conocimiento que se tiene sobre su manejo adecuado (Chávez et al., 2020). Esta falta de conocimientos técnicos hacen que los agricultores desconfíen de la eficacia de los biofertilizantes o bien sean aplicados en momentos inoportunos o en grandes volúmenes lo cual sigue representando costos altos de producción y por tanto los productores prefieran seguir empleando fertilizantes químicos (Afanador, 2017).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes la presente investigación tiene como objetivo estudiar la aplicación de *Aspergillus niger* P., como HSP en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y de este modo poder fomentar la agricultura sustentable a través de la implementación de prácticas ecológicas, como la sustitución de fertilizantes químicos por biofertilizantes.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo, en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el mejor momento y concentración de aplicación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo que favorece el desarrollo y rendimiento del cultivo de fréjol de acuerdo a su ciclo fenológico.
- Evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo del hongo *Aspergillus niger* comparando la disponibilidad de este nutriente en el suelo al inicio y al final del experimento.

2.3. Hipótesis

Ha: La inoculación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo, en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol tiene influencia sobre el desarrollo y rendimiento de la especie inoculada.

Ho: La inoculación de *Aspergillus niger* como hongo solubilizador de fósforo, en tres concentraciones y momentos diferentes del ciclo fenológico del cultivo de fréjol no tiene ningún efecto sobre el desarrollo y rendimiento de la especie inoculada.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. Importancia del fósforo en la agricultura

El fósforo (P) es un elemento esencial en la agricultura para el buen crecimiento de las plantas, porque las funciones que este desempeña no pueden ser ejecutadas por ningún otro elemento, sin embargo, este nutriente en el suelo se encuentra mayoritariamente en formas no disponibles para los cultivos, los cuales comúnmente lo requieren en cantidades relativamente grandes, pero debido a su restringida movilidad, las plantas lo absorben en mínimas cantidades. Por esta razón, para conseguir un crecimiento y reproducción óptimos de los cultivares, se requiere de un suministro adecuado de fósforo y la aplicación de alternativas que faciliten la absorción de este nutriente por las raíces de forma que, al suplir la necesidad de fósforo de las plantas, se vean favorecidos los procesos involucrados con éste nutriente como el desarrollo radicular y del grano, en el crecimiento y la floración (Munera, 2012; Corrales et al., 2014; Avellán et al., 2020).

3.1.1. Fertilizantes fosforados químicos

La revolución verde representó un cambio radical en la productividad de los cultivos, pues con esta se difundió el uso de fertilizantes químicos en la industria agrícola. A partir de esta etapa, la demanda de fertilizantes fosforados, ha ido aumentando cada vez más a nivel mundial. Sin embargo, a pesar de que los fertilizantes mejoran la productividad de los cultivos a corto plazo, diversos estudios indican que la adición desmedida de este tipo de insumos repercute de forma negativa la salud del suelo a largo plazo (Machado, 2017).

La eficiencia máxima de captación de fertilizantes químicos por parte de las plantas es solo del 30%, ya que en su mayoría el fosfato incorporado tiende rápidamente a fijarse en el suelo. Por esta razón, no es conveniente realizar aplicaciones excesivas, ya que conducen a riesgos de contaminación por su lixiviación hacia aguas subterráneas, degradación de la calidad de los suelos por exceso de salinidad, toxicidad en plantas y animales por acumulación de cadmio y también se ha observado efectos nocivos que produce su fabricación al medio ambiente (Armenta et al., 2010; Machado, 2017; Romero et al., 2019).

3.1.2. Fuentes de fósforo a nivel mundial

Antiguamente, las harinas de sangre, huesos y pescado, el estiércol y residuos vegetales, eran empleados como fuentes de fósforo, las cuales se hicieron comercialmente disponibles para los agricultores. Pero a medida que la demanda de alimentos y a la vez los requerimientos de productos fosfóricos crecieron, no fue suficiente el suministro de fósforo mediante estas fuentes, consecuentemente, la productividad de los suelos disminuyó. A partir de esta problemática se vio la necesidad de recurrir a depósitos de roca fosfórica como nuevas fuentes, mismas que con los avances de la química fueron tratadas con ácidos similares a los que existen en los suelos, para luego ser empleados como fertilizantes en la agricultura (Capelle, 2011).

Ahora en la actualidad, la industria mundial de fertilizantes fosforados y otros productos químicos se basa principalmente en la explotación de algunos yacimientos naturales de roca fosfórica, los cuales se encuentran distribuidos en diversas partes del mundo. Los depósitos que cuentan con mayor producción mundial de roca fosfórica se hallan en Marruecos, Sahara Occidental, la Federación Rusa, Estados Unidos, China y países de África. Además, se estima que cerca del 80 % de la producción a nivel mundial proviene de depósitos de origen marino, un 17 % es de origen ígneo, el resto procede de depósitos sedimentarios residuales y de tipo guano (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2007; Loughheed, 2011). Debido a que la composición química de las rocas de los distintos yacimientos del mundo es muy variable, su forma de empleo es distinta. Se pueden encontrar rocas fosfóricas duras y otras blandas dependiendo de su composición química y origen geológico. Las rocas duras, son de origen ígneo, y su uso directo no es conveniente, debido a que tienen alto contenido de fósforo total, pero poco soluble por esta razón son empleados para la fabricación de fertilizantes solubles, mientras que, las rocas blandas pueden ser de origen sedimentario y poseen un menor contenido de fósforo total, pero con una mayor proporción de fósforo soluble por lo que pueden emplearse directamente sobre el suelo (Navarro et al., 2014).

La tendencia futura sobre la producción mundial de roca fosfórica, está en cuatro países actualmente mayores productores de roca fosfórica, encontrando a Marruecos en la primera posición ya que podría poseer más de la mitad de las reservas mundiales de fosfato. También

puede provenir de China y Túnez, los cuales han aumentado su producción y de igual manera, de Australia, Iraq, Jordania y Sudáfrica de los que se espera un aumento de producción en los siguientes años. Además, existe un potencial para descubrir nuevos depósitos, es así que en 1999 dos nuevas minas de fosfatos se abrieron en Australia y Canadá. No obstante, se considera al mismo tiempo que muchos depósitos han sido encontrados y puestos en producción, otros se encuentran sin uso, y otros han sido agotados debido a la creciente demanda de fertilizantes fosforados (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2007; Capelle, 2011).

3.1.3. Importancia de fósforo en los cultivos

En las plantas, el fósforo se encuentra como ion fosfato ya sea en forma libre o como un compuesto orgánico, del cual un 75 % se encuentra en las vacuolas, y el 25 % restante en la matriz y los orgánulos citoplasmáticos. Su importancia en el sistema de los vegetales radica en que este elemento es el principal componente de muchas moléculas y estructuras de interés, tales como los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfoproteínas, enzimas, fosfatos de azúcar, en los fosfolípidos los cuales son fundamentales en las estructuras membranosas de las células, y en la molécula de adenosin trifosfato (ATP) la cual juega un rol importante en el metabolismo energético. Además, este nutriente está involucrado con distintos procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas, entre estos la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de almidón (Fernández, 2007; Azcón, 2013; Muñoz, 2016; Avellán et al., 2020).

En la mayoría de los vegetales el fosfato se redistribuye fácilmente de un órgano a otro almacenándose inicialmente en las hojas jóvenes, posteriormente en las flores y finalmente en las semillas en desarrollo, en consecuencia, los síntomas de deficiencia se presentan primero en las hojas adultas o bajas (Azcón, 2013). Cuando existe una deficiencia de este nutriente, el desarrollo de las plantas se ve afectado debido a que la producción de proteínas, la síntesis de almidón, celulosa y sacarosa se reducen. De igual forma, las plantas deficientes de fósforo presentan enanismo debido a la reducción en la expansión celular, también pueden exhibir un color verde intenso o púrpura volviéndose pardusco a medida que van muriendo, o bien, muestran un tallo raquítrico, y la madurez se retarda debido a que el sistema radicular no se desarrolla satisfactoriamente (Moreno, 2007; Pérez et al., 2012; Muñoz, 2016).

3.1.4. Fósforo en el suelo

El fósforo en los suelos es abundante, de forma orgánica e inorgánica, sin embargo, no está disponible para las plantas, por lo tanto, el suelo es considerado deficiente en fósforo. De este modo, este nutriente se vuelve uno de los elementos que limitan la productividad de los cultivos (Saghir et al., 2010). En los suelos el contenido de fósforo puede variar entre 200 y 5000 mg/kg, con una media de 600 mg/kg, incluyendo formas orgánicas e inorgánicas. Generalmente, en los suelos el fósforo inorgánico comprende entre el 50 % y 70% del total, aunque puede variar entre el 10% y 90% dependiendo del tipo de suelo. De este fósforo inorgánico, solo una pequeña parte es aprovechada por las plantas (Fernández, 2007; Patiño y Sanclemente, 2014).

3.1.3.1. Formas de fósforo en el suelo

En el suelo la cantidad de fósforo se expresa como P_2O_5 y se encuentra de distintas formas que pueden ser clasificadas como fósforo inorgánico y orgánico. La proporción de estas dos formas de fósforo en el suelo, depende de distintos factores propios del suelo como por ejemplo el pH, tipo de vegetación presente, actividad microbiana e incorporación de fertilizantes (Rooney et al., 2009, como se citó en Beltrán, 2014).

Fósforo orgánico

El fósforo orgánico está presente en la materia orgánica, que se origina de los restos animales y vegetales que son degradados por los microorganismos del suelo, los cuales hidrolizan el fósforo orgánico mediante enzimas que liberan al fosfato que es asimilable por las plantas (Corrales et al., 2014). También pequeñas cantidades de fósforo orgánico soluble están en la solución de suelo sirviendo como importante fuente de P para las plantas (Bonadeo et al., 2017). El nivel de fósforo orgánico en los suelos puede variar entre un 3 y un 85% del fósforo total y puede representar cerca del 50% del fósforo total insoluble (Munera, 2012). Una gran porción de este está representada por los fosfatos de inositol, los ácidos nucleicos y en una menor cantidad por otros ésteres de fosfato como fosfolípidos presentes en membranas biológicas. Por otra parte, el fósforo presente en la biomasa de células microbianas representa una porción importante de fósforo orgánico presente en los suelos (Beltrán, 2014).

Fósforo inorgánico

De las dos formas de fósforo que se encuentran en el suelo, el fosfato inorgánico es casi siempre el predominante, excepto en los suelos donde la materia orgánica se halla en mayor proporción. Este está presente en minerales tanto primarios como secundarios, siendo los de mayor importancia los cálcicos, los aluminicos y los férricos (Bonadeo et al., 2017). Estos compuestos se hallan en forma de sales en solución, sales cristalinas, o sales absorbidas por los coloides del suelo. La proporción de cada uno de estos compuestos varía según el origen del suelo, los niveles de materia orgánica y el pH (Munera, 2012; Beltrán, 2014).

Tabla 1

Formas de fósforo inorgánico presente en el suelo

Tipo de fosfato	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Muy abundante
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$	Menos abundante
	Fluoroapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaFe}_2$	Muy abundante
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$	Menos abundante
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Menor solubilidad
	Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
Fosfato de aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles

Nota: Adaptado de Bobadilla et al., (2008), como se citó en Beltrán (2014).

3.1.3.2. Ciclo del fósforo

Las rocas son la fuente original de fósforo el cual se halla unido al oxígeno formando fosfatos. Cuando estas rocas están expuestas al ambiente, la intemperie y las lluvias los fosfatos se disuelven. En el perfil del suelo, la mayor cantidad de fósforo disponible se encuentra en la superficie y este va disminuyendo hasta el horizonte A. Esta disminución del fósforo disponible presente se debe a que en esta zona las raíces lo absorben, existe mayor densidad de las mismas, puede absorberse en los coloides del suelo, y hay mayor actividad microbiana. Por otro lado, el mayor contenido de fósforo en la zona más superficial es atribuido a la reintegración del fósforo absorbido por las plantas y la retención de éste por el suelo superficial (Corrales et al., 2014; Bonadeo et al., 2017).

Una vez disueltos los iones fosfatos, los vegetales toman el fósforo disponible a través de sus raíces y lo distribuyen en todas las células. A su vez, los animales lo adquieren al alimentarse de los vegetales. Al morir las plantas y los animales a través de sus excretas, liberan fósforo insoluble y los microorganismos encargados de la solubilización convierten el fósforo en fosfatos inorgánicos disueltos. Parte de dichos fosfatos, descienden hasta el fondo y forman rocas (Corrales et al., 2014). La conversión de fosfatos inorgánicos disponibles en formas orgánicas no disponibles, se conoce como inmovilización y puede ocurrir por fijación, adsorción, precipitación y oclusión. El proceso contrario a la inmovilización es la mineralización que se entiende como el proceso en el que las formas orgánicas se convierten en ortofosfatos (Beltrán, 2014). También pueden existir pérdidas de fósforo del sistema que pueden ocurrir mayoritariamente por escurrimiento, erosión, exportación por cosechas y en menor medida por lavado (Bonadeo, Moreno, Bongiovanni, Marzari, y Ganum, 2017).

3.1.3.3. Retención o fijación de fósforo en la superficie del suelo

En los sistemas agrícolas, el fósforo se incorpora al suelo mediante fertilizantes tanto naturales de origen animal o vegetal, como fertilizantes químicos extraídos de depósitos minerales (Kehler et al., 2021). Cuando se incorpora fósforo al suelo mediante estos fertilizantes, rápidamente los iones fosfato se precipitan en la solución del suelo con iones de hierro (Fe) o aluminio (Al) en suelos ácidos y con iones de calcio (Ca) y magnesio (Mg) en suelos alcalinos o calcáreos, formando así compuestos insolubles, o bien, los iones fosfato

de estos productos pueden ser absorbidos fuertemente sobre la superficie de las partículas de arcilla, óxidos e hidróxidos de Fe y Al. Estos procesos son conocidos como fijación de fosfatos que como consecuencia hacen que el fósforo se mueva lentamente hacia la solución del suelo por difusión y difícilmente sea capturado por las plantas (Osorio, 2009; Bonadeo et al., 2017; Romero, 2018).

Las diferentes formas de fijación del fósforo en el suelo son: a) fijación biológica, b) por precipitación, c) por adsorción y, d) por sustitución isomórfica. La fijación biológica se produce cuando los vegetales y microorganismos toman el fósforo y lo sustraen temporalmente del suelo. Cuando mueren y se descomponen el fósforo que contienen en su biomasa es liberado en formas orgánicas e inorgánicas. Pero algunos fosfatos orgánicos son difíciles de descomponer, por lo que tienden a acumularse en la matriz del suelo, cuando este presenta condiciones ácidas. Por otra parte, la retención por precipitación se produce cuando se forman compuestos insolubles como fosfatos de hierro, aluminio, manganeso o calcio. La retención por adsorción se produce sobre las superficies coloidales, en especial sobre las arcillas cuando el pH es bajo (ácido), esto debido al aumento de las cargas positivas sobre las superficies coloidales. Por último, la fijación por sustitución isomórfica se produce a pH un tanto mayor al de la fijación por adsorción y en este caso el fósforo entra en la red cristalina reemplazando a los hidroxilos (Beltrán, 2014; Bonadeo et al., 2017).

3.2. Microorganismos solubilizadores de fósforo

Se considera al suelo como un sistema complejo comprendido por microorganismos, minerales, materia orgánica (viva o muerta), agua y aire que comparten un espacio dinámico en el que se produce una interacción físico química entre dichos componentes. Dentro de la población microbial existen bacterias, actinomicetos, cianobacterias, algas, protozoos, virus y hongos. De estos, los más abundantes son las bacterias, pero los hongos por su mayor tamaño, representan alrededor del 70 % de la biomasa (Osorio, 2009). Cuando los suelos presentan contenidos de materia orgánica mayores al 2% contienen una incrementada población y diversidad de microorganismos. Cada uno de estos microorganismos existentes en el suelo, cumplen con funciones distintas que están relacionadas con la fertilidad del suelo, como la descomposición de la materia orgánica, los ciclos biogeoquímicos de varios elementos (como por ejemplo del carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, entre otros),

producción de antibióticos, formación de asociaciones simbióticas para aumentar la captura de nutrientes por las plantas, protección contra organismos patógenos, descomposición de contaminantes (biorremediación), etc. (Osorio, 2009; Chávez et al., 2020).

Se conoce que algunos de los microorganismos del suelo que se hallan interactuando con las raíces, pueden incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad. Por estas importantes funciones son reconocidos como PGPM por sus siglas en inglés y que en español se traduce como “Microorganismos promotores del crecimiento vegetal” (Rosas et al., como se citó en Beltrán, 2014). Dentro de este amplio y diverso grupo, se encuentran los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF), mismos que con su acción metabólica cumplen un rol importante en la transformación de este nutriente, movilizándolo desde el fosfato inorgánico insoluble adherido en la matriz mineral del suelo hasta la solución del suelo donde puede ser aprovechado por las raíces de las plantas, las cuales a cambio les proporcionan compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Beltrán, 2014).

Entre los MSF los más conocidos son aquellos géneros de hongos pertenecientes a las micorrizas que están en asociación simbiótica con las plantas, sin embargo, existe una gran diversidad de microorganismos que cumplen con esta función, pues se incluyen desde bacterias, hongos, cromistas, protozoos, y ciertos nematodos (Patiño et al., 2014; Vargas y Castro, 2019). Estos microorganismos se hallan en todos los suelos y la cantidad es variable de uno a otro, y de igual modo, la cantidad varía según la profundidad, es por esta razón que en la rizósfera la concentración de estos es más alta mientras que en las zonas no rizosféricas es menor, esto se debe a que los exudados radicales y detritos (o residuos) vegetales proporcionan el sustrato energético para que se lleve a cabo la actividad microbiana (Osorio, 2009; Beltrán, 2014). La población de MSF también varía dependiendo del manejo del suelo y el cultivo, por ejemplo, la concentración de estos es de 10^5 a 10^6 células por gramo de suelo seco en leguminosas forrajeras y de 10^3 a 10^6 en gramíneas forrajeras. Esta población, puede disminuir cuando el suelo es sometido a cualquier tipo de estrés como escasez de agua, nutrientes, salinidad, contaminación por metales pesados, entre otros factores como consecuencia de las prácticas agrícolas (Brito y Ulla, 2012; Chávez et al., 2020).

La importancia de la actividad solubilizadora de fósforo para los microorganismos radica en que este elemento forma parte de tejidos y estructuras microbianas, de modo que la concentración de fósforo en estos microorganismos puede ser hasta 10 veces más elevada que en las plantas. En el caso de los hongos, el fósforo se halla repartido entre un 0.5 y 1.0 % de fósforo en el micelio. De forma general, la mayor parte del fósforo está en el ARN de los microorganismos (de un 30 a 50%). Cuando el medio en el que se encuentran estos microorganismos, presenta bajas concentraciones de fósforo, estos tienen la necesidad de solubilizar y acumular un exceso de fósforo para cubrir sus requerimientos y así poder sobrevivir (Pérez et al., 2012).

En laboratorio, la capacidad solubilizadora de fosfatos ha sido determinada en medios de cultivo sintéticos con alguna fuente de fosfato de calcio, mediante la formación de zonas claras o halos de disolución de los cristales de fosfato, efectuados por las colonias de los microorganismos que poseen esta actividad (Pérez et al., 2012).

En los últimos cien años se han desarrollado numerosos estudios enfocados en el aislamiento, caracterización, y evaluación del potencial solubilizador de diferentes microorganismos del suelo (Hernández et al., 2011). La importancia de estas investigaciones es que uno de los problemas más importantes en la agricultura, es la baja disponibilidad de fósforo en el suelo debido a que muchos suelos tienen una alta capacidad de fijación del fósforo, lo cual hace que su manejo sea más difícil. En años pasados, las alternativas por las que se optaba para reducir la fijación de fósforo, consistían en aplicar altas dosis de fertilizantes solubles. Sin embargo, la eficiencia de los fertilizantes fosfóricos sigue siendo baja (5-10%) debido a alta fijación en los suelos, otra estrategia es el uso de rocas fosfóricas, pero estos materiales son insolubles especialmente en suelos neutros y alcalinos. Por todo esto, el uso de MSP se considera como una estrategia mucho más viable, amigable con el medio ambiente y permite incrementar la solubilidad de la roca fosfórica y el fósforo adherido o fijado en el suelo (Osorio, 2009; Pérez et al., 2012).

3.2.1. Hongos solubilizadores de fósforo

Al igual que el resto de microorganismos del suelo, los hongos son importantes componentes de la biota del suelo, y la riqueza de estos depende de la profundidad del suelo y de las condiciones nutricionales en las que se encuentra. Según varias investigaciones, existe una

amplia cantidad de hongos que presentan esta capacidad de solubilizar el fosfato insoluble siendo los principales representantes los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Syrialidium*, *Talaromyces*, y *Trichocladium* (Beltrán, 2014). De los géneros descritos, en la rizósfera la mayoría pertenecen al género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales son considerados como los más importantes y pertenecen al grupo de hongos filamentosos, mismos que son fundamentales en la solubilización del fósforo retenido (Elias et al., 2016; Yadav et al., 2020).

La importancia de los hongos como MSP, está dada porque estos pueden atravesar largas distancias más fácilmente que las bacterias. Además, se ha observado que producen hasta diez veces más ácidos orgánicos en comparación con las bacterias y, por lo tanto, estos llevan una mayor solubilización de fósforo tras cultivos in vitro. En este sentido, la inoculación de hongos solubilizadores de fósforo aumenta el nivel de fósforo disponible en la solución del suelo al movilizar el fósforo fijado, lo que se traduce en un mejor crecimiento y desarrollo de los vegetales. Adicionalmente, ciertos hongos en asociación con las raíces no solo presentan características como la solubilización de minerales, sino también pueden actuar como controladores biológicos contra plagas y pueden producir metabolitos secundarios conocidos como fitohormonas las cuales son estimulantes para el desarrollo vegetal (Li et al., 2016; Pralhad y Ashokrao, 2017). Por otra parte, según otros investigadores, señalan que es recomendable usar hongos solubilizadores de fósforo, ya que las bacterias pueden perder su capacidad solubilizadora de fósforo después de varios ciclos de cultivo in vitro, pero este argumento es bastante controversial (Osorio, 2009).

La eficiencia con la que los microorganismos pueden solubilizar el fósforo, ha sido refutado por muchos investigadores porque: a) las sustancias orgánicas necesarias para estos microorganismos resultan ser insuficientes en sitios no-rizosféricos, b) existe antagonismo (o rivalidad) y competencia con otros microorganismos presentes en la rizósfera y c) existe una baja movilización de fosfatos solubilizados a través del suelo, dado que éstos pueden ser nuevamente fijados por las partículas del suelo (Osorio, 2009). Por otra parte, también se debe considerar la ecología en el cuál se desenvuelven los MSP, ya que la efectividad al ser inoculados como biofertilizantes, depende de la capacidad de que los aislados vuelvan a colonizar la rizósfera y mantengan en ella una alta actividad. Además, las condiciones del

suelo como pH, salinidad, y temperatura, especialmente condiciones de estrés, entre otras propiedades determinan su actividad estabilizadora (Pérez et al., 2012).

3.2.2. Mecanismos de solubilización de fosfatos

Los mecanismos por los que los microorganismos logran solubilizar de fósforo del suelo son los siguientes: a) liberación de compuestos complejos como, por ejemplo, ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo y CO_2 , b) liberación de enzimas extracelulares y c) la liberación de fósforo durante la degradación del sustrato (Pralhad y Ashokrao, 2017). Sin embargo, los principales mecanismos son la producción de ácidos orgánicos y la liberación de protones a la solución del suelo. Por su parte, los ácidos son compuestos de bajo peso molecular entre los que han sido reportados por los investigadores de MSP, son: son ácido acético, butírico, succínico, málico, glucónico, oxálico, cítrico, láctico, fumárico, láctico, tartárico y aspártico. Estos ácidos son el producto del metabolismo microbiano, en especial por la respiración oxidativa o por fermentación de carbono orgánico soluble (Osorio, 2009; Patiño y Sanclemente, 2014).

Cuando el suelo es inoculado con microorganismos solubilizadores de fósforo, estos tienden a secretar ácidos orgánicos con lo cual disminuyen el pH de la rizósfera y permite disociar los enlaces de los complejos formados entre el fósforo el cual tiene carga negativa y se une con iones metálicos como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} que vuelven a este elemento no asimilable. Un pH de 4 es el preciso para solubilizar el fósforo inorgánico fijado, pero este grado de acidez no es muy común (Corrales et al., 2014; Restrepo et al., 2017).

De los hongos solubilizadores de fósforo, los más estudiados son los correspondientes al género *Penicillium* y *Aspergillus*, cuyos principales mecanismos de solubilización efectuados por estos hongos es la producción de distintos ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, málico y glucónico) y la quelación de los minerales que forman los complejos insolubles con el fósforo (Hernández et al., 2011).

3.2.3. Inoculaciones de hongos solubilizadores de fósforo en cultivos

Uno de los primeros estudios sobre los microorganismos solubilizadores de fósforo fue reportado por Pikovskaia en 1948, quién reportó ciertas bacterias que secretan ácido láctico

que actúan sobre el fósforo insoluble en cultivos *in vitro* cuyo medio sintético para cultivar a estos microorganismos, lleva su nombre y fue estandarizado como el primer medio de cultivo para el aislamiento de organismos solubilizadores de fósforo. Años más tarde se encontraron hongos también con esta capacidad solubilizadora (Beltrán, 2014).

Según investigaciones realizadas sobre suelo rizosférico de trigo, de dónde se logró aislar tres cepas de hongos solubilizadores de fósforo tolerantes en condiciones de estrés, identificados como *Aspergillus niger* P., *Aspergillus japonicus* y *Penicillium simplicissimum*, las cuales, demostraron tener diferentes capacidades de solubilización en medios de cultivo con roca fosfórica como única fuente de fósforo. De estas cepas probadas, la cepa de *Penicillium simplicissimum* fue la más efectiva, seguida por *Aspergillus niger* P., y *Aspergillus japonicus*. Todas las cepas exhibieron altos niveles de tolerancia al estrés y *Aspergillus niger* P., mostró tolerancia a la temperatura (10 a 45 °C) y al pH (4-11) más que las otras (Xiao et al., 2011). En Sudamérica, también destacan investigaciones en las que se determinó la capacidad solubilizadora y eficiencia por hongos obtenidos de la rizósfera de maní para establecer la posibilidad de su empleo en suelos ácidos enmendados con fuentes insolubles de fósforo. De los hongos aislados, la mayoría correspondieron a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* mismos que presentaron una mayor capacidad solubilizadora. Asimismo, se han encontrado hongos solubilizadores en la rizósfera de pasto en fincas ganaderas y de igual manera, los más predominantes fueron los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus niger* P., (Pérez et al., 2012 como se citó en Beltrán, 2014).

En varios estudios la utilización de biofertilizantes microbianos han sido exitosamente empleados como alternativos a la fertilización tradicional mediante insumos químicos. Es así que existen investigaciones en condiciones de invernadero que demuestran la efectividad de la inoculación de este grupo de hongos en diferentes cultivos tales como soya, garbanzo, lechuga, maíz, cacahuate, trigo, amaranto, árbol de sisu, jitomate, palma de aceite y papa (Romero, 2018). Bajo condiciones de campo en cuatro investigaciones se ha demostrado que la aplicación de microorganismos nativos actúa como promotores del crecimiento vegetal, siendo la inoculación de suelos o semillas el método más empleado para mejorar el crecimiento y producción de las cosechas (Banerjee et al., 2010 como se citó en Beltrán, 2014).

Gracias a estas investigaciones en Australia, se han fabricado biofertilizantes a base de *Penicillium bilaiae* y *Penicillium radicum*, estos han sido lanzados exitosamente comercialmente. Por otra parte en Canadá el hongo *Penicillium bilaiae* se empleó para usarlo como biofertilizante que posteriormente se comercializó bajo la marca JumStart. Dicho producto en Canadá se registró para emplearlo especialmente en el cultivo de trigo en 1990, pero años después ha sido empleado en los principales cultivos. Por su parte, el fosfol a base de *Penicillium janthinellum* fue creado en especial para el cultivo de arroz (Moreno et al., 2007 como se citó en Patiño y Sanclemente, 2014).

3.2.4. *Aspergillus niger*

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza dado que estos no muestran condiciones abióticas selectivas, además, puede dispersar fácilmente sus esporas lo que les permite permanecer en el medio ambiente durante un largo tiempo. Generalmente, las especies correspondientes a este género crecen en un amplio rango de temperatura que va desde 6 a 55 °C y a una humedad relativa baja (Lina y León, 2012; Viteri et al., 2022). Adicionalmente, pueden crecer sobre distintos substratos que incluyen polímeros vegetales, heces y tejidos de animales, ya que pueden producir diferentes enzimas que los degradan en compuestos útiles (Viteri et al., 2022). Además, en este género se estima que existen entre 260 y 837 especies, pero solo unas pocas se comportan como patógenos, mientras que otras especies son importantes a nivel industrial como productoras de proteínas, otras participan en el equilibrio edáfico mediante la degradación de los residuos vegetales o animales, el ciclaje de nutrientes y la descontaminación de suelos, otras características importantes son la tolerancia del halo, acentuación del estrés salino a las plantas, y también pueden colonizar raíces facilitando su crecimiento y mejorando su calidad. (Lina y León, 2012; Viteri et al., 2022).

Dentro de este género, es muy frecuente encontrar hongos solubilizadores de fósforo, este es el caso del hongo *Aspergillus niger* P., el cuál es un hongo filamentoso que exhibe la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico capturado en la fracción mineral, así como también se ha demostrado en varios estudios que tiene una mayor capacidad para reducir la concentración de metales pesados (Hernando et al., 2012; Viteri et al., 2022).

3.3. Biofertilizantes

El término “biofertilizante” suele confundirse para describir a los fertilizantes orgánicos como por ejemplo el compost, estiércol de animales, entre otros, pero lo cierto es que no es lo mismo, pues los abonos orgánicos no solo incluyen microorganismos vivos, sino también se componen de materia en descomposición, mientras que los biofertilizantes son preparados sólidos o líquidos que poseen cepas individuales o consorcios de microorganismos del suelo vivos o latentes como hongos, bacterias, levaduras, entre otros microorganismos benéficos que, al ser aplicados al suelo, en semillas o superficies de plantas, son capaces de colonizar el interior de la planta o aumentar el número de estos microorganismos en la rizósfera, lo cual permite acelerar los procesos microbianos y por ende promueve el buen desarrollo de las plantas gracias a un aumento en el crecimiento radicular, incremento de la disponibilidad de nutrientes primarios que pueden ser fácilmente asimilables por las plantas cultivadas (Afanador, 2017; Sotelo et al., 2020).

Estas sustancias como biofertilizantes pueden aplicarse de forma exclusiva o en combinación con abonos orgánicos, y tiene la finalidad de sustituir parcial o totalmente la fertilización química, para reducir tanto la contaminación ambiental como los daños en la salud de las personas y animales, que se originan con el inadecuado uso de los agroquímicos (Armenta et al., 2010). Asimismo, su uso pretende reducir los elevados costos de producción por los fertilizantes que van incrementando cada vez más su precio debido al aumento de costos de movilización hacia otros países y la demanda de energía que estos requieren para su fabricación (Chávez et al., 2020). En este sentido, se considera que los biofertilizantes resultan ser más baratos, pues tienen un costo para el productor que representa solo el 10 % del costo de la fertilización química y entre no más del 2 al 3 % de los costos de producción del cultivo (Sotelo et al., 2020). Sin embargo, su uso ha sido poco difundido pese a que estos son fáciles de usar, no requieren de conocimientos técnicos excesivos ni de tecnologías avanzadas, y tampoco es una técnica nueva, pues los biofertilizantes han sido empleados en algunos países tropicales durante más de medio siglo. Además, existe una escasa mejora en los protocolos de aplicación y el conocimiento sobre el uso adecuado de los biofertilizantes solo se ha quedado en conocimientos de los ecólogos y agricultores técnicos (Afanador, 2017; Sotelo et al., 2020).

3.3.1. Momentos ideales para la biofertilización fosfórica

Los momentos ideales (desarrollo vegetativo, prefloración, floración, fructificación, cosecha, estrés, etc.) para aplicar biofertilizantes dependen de los cultivos si son perennes o de temporada ya que cada cultivo tiene sus exigencias específicas para cada momento o etapa de desarrollo vegetativo en el que se encuentre. Por esto, es muy importante conocer las principales exigencias en nutrimentos que cada cultivo necesita en cada momento de crecimiento y diferenciación vegetativa. Para esto es importante contar con un análisis completo de suelos o foliar para de este modo seleccionar el biofertilizante más adecuado en su dosificación ideal (Restrepo, 2007).

En este sentido, la biofertilización fosfórica es conveniente realizarla cuando el cultivo más requiere de este nutriente. Generalmente, en muchas especies vegetales debido a que la parte aérea de la planta crece más rápidamente que la raíz a inicios del ciclo, el requerimiento diario de fósforo por unidad de longitud de raíz es mayor en las primeras etapas del ciclo del cultivo. De igual forma, una planta con pocas raíces por unidad de parte aérea requiere mayores niveles de fósforo que una planta con abundante número de raíces (Munera, 2012). De ahí que los agricultores incorporen este nutriente durante la siembra para favorecer el crecimiento radicular o como en muchas regiones agrícolas puede aplicarse fósforo después de que la planta ha emergido (Casbis y Villegas, 2016). En algunas especies, se presenta un segundo periodo de alta necesidad de fósforo, siendo esta al final del cultivo cuando el decrecimiento en longitud de raíces viables es mucho más rápido que la disponibilidad de nutrientes (Munera, 2012).

3.4. Cultivo de fréjol

El fréjol o *Phaseolus vulgaris* L., es una especie de planta leguminosa perteneciente al grupo de las dicotiledóneas, cuyo grano (o semilla) es comestible e importante en la alimentación de las personas debido a su alto contenido en proteínas, carbohidratos, minerales y fibra (Peralta et al., 2010). Por otra parte, también presenta un impacto ambiental, por su participación en la fijación de nitrógeno, gracias a la formación de estructuras especializadas en la raíz llamadas nódulos (Tofiño et al., 2016).

3.4.1. Origen

Tras diversas investigaciones sobre el origen del fréjol, se ha establecido que este probablemente viene de Mesoamérica, específicamente en la ciudad de México, desde Jalisco hasta Oaxaca, y a partir de allí se extendería a Sudamérica (Hernández et al., 2013). De igual forma, México es considerado el centro de domesticación de fréjol silvestre, el cual ha sufrido varios cambios tanto fisiológicos como morfológicos durante este proceso y en cultivo ha sido combinado comúnmente con maíz (Saburido y Herrera, 2015).

3.4.2. Cultivo de fréjol en el Ecuador

En Ecuador los cultivos de plantas leguminosas son importantes dentro de los sistemas agro productivos, en especial en la región Sierra, debido a que pueden ser cultivadas de diversas maneras, ya sea en monocultivos, en rotación con otros cultivos, intercaladas y en combinación con otras especies (Peralta et al., 2010). Por otro lado, se considera que las cinco especies de plantas leguminosas de importancia económica en el país son la arveja, el chocho, el frijol, el haba y la lenteja (Sistema para la Integración Centroamericana [SICA], 2002 como se citó en Peralta et al., 2010). De estas, el fréjol es la leguminosa más cultivada y consumida en el Ecuador, ya sea como grano seco o grano verde. La superficie promedio cosechada en el país en los últimos cinco años fue de 22.186 hectáreas, de las cuales 3.410 hectáreas correspondieron a fréjol arbustivo y 18.776 hectáreas para fréjol de tipo voluble. Además, el cultivo de esta leguminosa lo realizan principalmente los pequeños agricultores para el autoconsumo y abastecimiento del mercado interno (Garcés et al., 2015).

El rendimiento promedio de fréjol registrado en Ecuador es bajo, de 430 kg/ha en monocultivo y 110 kg/ha cuando está asociado al maíz. Estos bajos rendimientos están relacionados principalmente a enfermedades foliares, a estreses abióticos como sequía y baja fertilidad de suelos. Sin embargo, la presencia de enfermedades es la principal causa de pérdidas, siendo en Ecuador las más importantes la roya, antracnosis, y mancha angular. Por otra parte, se considera que el 95% del fréjol que se produce en el país, se cultiva en provincias de la Sierra (Torres et al., 2013).

3.4.3. Taxonomía

Tabla 2

Clasificación taxonómica del cultivo de fréjol

Nombre científico	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnolipsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>Vulgaris</i>
Variedad	I-481 Rojo del valle

Nota: Adaptado de Valladares (2010).

3.4.4. Descripción de la variedad Rojo del valle o INIAP 481

La variedad INIAP 481 rojo del valle proviene del cruzamiento realizado por la Universidad Estatal de Michigan (EE. UU) y por el Programa de Leguminosas del INIAP en el año 2002. Las líneas empleadas para este cruzamiento y fitomejoramiento fueron SEL 1308 de grano pequeño color negro, Red Hawk de grano grande color rojo y posteriormente se realizaron retrocruzas sucesivas hacia materiales comerciales de Ecuador como INIAP 418 Je.Ma., de grano rojo moteado resistente a roya y dos retrocruzas hacia la variedad local Paragachi de grano rojo moteado, muy susceptible a roya. Finalmente, se obtuvo la línea TP6 de fréjol

arbustivo de color rojo moteado de hábito de crecimiento tipo 2, es decir con guía pequeña y caracterizándose por altos rendimientos y resistencia a roya. De igual forma, cuando fueron evaluadas en los valles de los ríos Chota y Mira, sobresalió por poseer raíz profunda, abundante producción de raíces secundarias, resistencia intermedia a pudriciones radiculares, con lo cual le permite una buena absorción de nutrientes y agua. Posteriormente, en el 2010 se realizó el prelanzamiento de la línea TP6 con el nombre INIAP 481 Rojo del valle y en mayo del 2012 fue liberada para su uso público y registrada en el Departamento Nacional de Recursos Filogenéticos con el código “ECU-17995” (Peralta et al., 2012; Peralta et al., 2014).

Tabla 3

Caracterización morfológica del fréjol INIAP 481 “Rojo del valle”

Descriptor	Medida
Hábito de crecimiento	Indeterminado tipo II (con guía pequeña)
Altura de la planta	45 a 50 cm
Color de la flor	Blanco
Color de grano tierno	Blanco/rosado
Color del grano seco	Rojo moteado con crema
Forma del grano	Arriñonado
Tamaño del grano seco	Grande
Largo de la vaina	11 a 13 cm

Nota: Adaptado de Peralta et al., (2012)

Tabla 4*Características agronómicas fréjol INIAP 481 “Rojo del valle”*

Descriptor	Medida
Número de vainas por planta	10 a 12
Número de granos por vaina	4 a 5
Días a la floración	45 a 52
Días a madurez fisiológica	85 a 95
Días a la cosecha en seco	100 a 110
Rendimiento	Grano seco 1437 kg/ha
Reacción a enfermedades	Resistente a roya y pudrición de raíz
Reacción a plagas	Resistente a lorito verde y trips

Nota: Adaptado de Peralta et al., (2012)

3.4.5. Distribución y adaptación

Para su distribución los agricultores de los Comités de Investigación Agrícola Local (CIALs) de Chota, Mira, y Urcuquí están capacitados para la producción y distribución de semilla. La variedad Rojo del valle se adapta muy bien como en las localidades del valle del Chota (Carchi, Imbabura), Pallatanga (Chimborazo), Chillanes (Bolívar) donde la altitud varía de 1400 a 2400 msnm (Peralta et al., 2012). En cuanto al clima, el fréjol puede adaptarse a temperaturas de 16 a 20°C y 300 a 700 mm de precipitación en el ciclo. Prefieren suelos francos, arenosos, limosos, arcillosos, buen drenaje y pH de 5.5 a 7.5 (Peralta et al., 2013).

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Materiales de laboratorio

- Asas microbiológicas
- Bisturí
- Cajas petri
- Cámara de Neubauer
- Frascos de vidrio boeco
- Probeta
- Micro pipetas
- Mechero Bunsen
- Puntas para micropipetas
- Para film
- Papel aluminio
- Varilla de agitación
- Porta y cubre objetos
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación

Equipos

- Autoclave (N-BIOTEK)
- Balanza analítica (aeADAM)
- Estufa (MEMMERT)
- Campana de flujo laminar (N-BIOTEK)
- Microscopio óptico compuesto
- Vortex (MIXER -Labnet)
- Termómetro (GOVEE)
- Anemómetro (MT-912 LIGHT METER)

Reactivos

- Agua destilada esterilizada
- Agar Pikovskaya
- Alcohol
- Caldo nutritivo
- PDA (Agar de Papa y Dextrosa)
- Goma arábica

Materiales agrícolas

- Clavos
- Flexómetro
- Plástico para invernadero
- Palos de madera
- Martillo
- Azadilla
- Machete
- Rastrillo tipo abanico
- Palets
- Fundas plásticas de polietileno (35 cm x 43 cm)
- Bandejas plásticas
- Libreta de campo
- Sacos quintaleros
- Fertilizante (Roca fosfórica)
- Red metálica (5x5 mm)

4.2. Métodos

4.2.1. Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador - Sede Ibarra (PUCE-SI). La misma se efectuó en dos partes esenciales. La primera se desarrolló en el laboratorio de Microbiología para la reactivación e identificación del hongo solubilizador de fósforo, la evaluación del índice de solubilización de fosfatos in vitro por la cepa fúngica, y preparación del inóculo. La segunda parte, se llevó a cabo en uno de los invernaderos de tipo multicapilla de la Granja Experimental de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) para el establecimiento del cultivo de fréjol, inoculación fúngica, y seguimiento del cultivo en sus diferentes etapas.

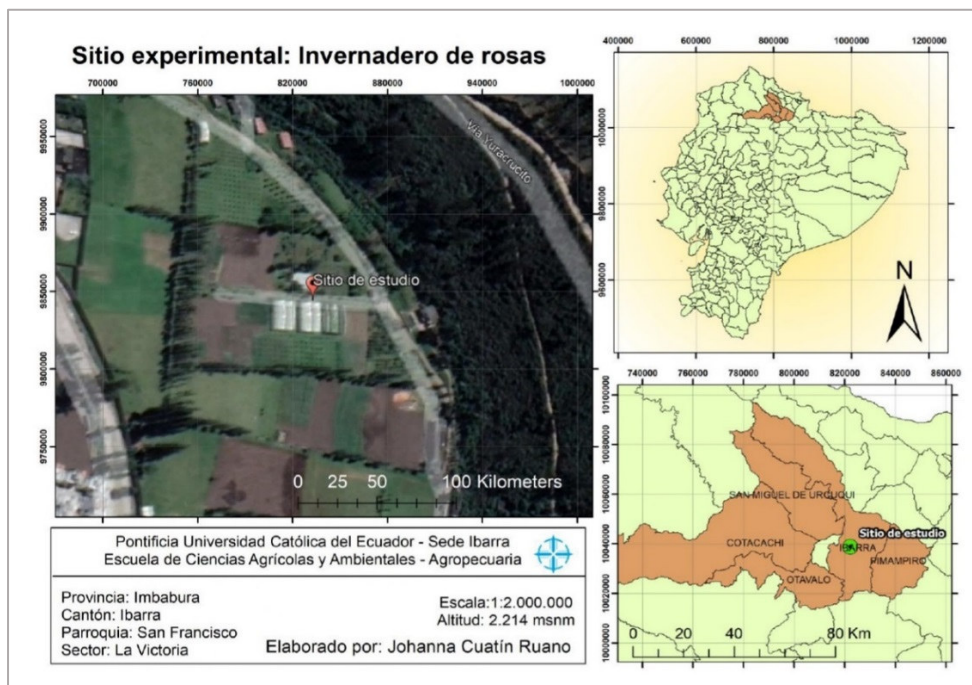
Tabla 5

Ubicación geográfica del sitio experimental

Ubicación geográfica	
Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Parroquia	San Francisco
Sector	La Victoria
Coordenadas geográficas	
Latitud	00° 21' 04" N
Longitud	78° 06' 23" W
Altitud	2 214 m.s.n.m.

Figura 1

Zonificación del invernadero de la granja experimental ECAA



Nota: Obtenido de Google Earth.

4.2.2. Características agroclimáticas del sitio experimental

Las condiciones climáticas dentro del invernadero durante el experimento fueron registradas mediante sensores como un anemómetro y un termómetro.

Tabla 6

Condiciones agroclimáticas del invernadero o sitio experimental

Parámetro	Rango
Temperatura promedio	23,1 °C
Temperatura mínima	5 °C
Temperatura máxima	46 °C
Humedad relativa promedio	46,3 %

4.2.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software InfoStat (versión libre 2017.1.2). Para el análisis estadístico de cada variable se partió de pruebas de normalidad mediante la prueba de shapiro-wilk, y homogeneidad mediante la prueba de Levene. Según sea el caso, se procedió a realizar el análisis de varianza (ADEVA) y las diferencias significativas entre tratamientos, con un nivel de significancia al 5% y bajo la prueba de Tukey.

Tabla 7

Esquema de análisis ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	32
Tratamientos	10
Factor A	2
Factor B	2
Interacción A x B	4
Testigo 1 vs Testigo 2	1
Testigo 1-Testigo 2 vs Resto	1
Error experimental	22

4.2.4. Diseño experimental

Dadas las condiciones controladas en el invernadero o lugar de experimentación como temperatura, humedad, velocidad del viento y al establecer unidades experimentales homogéneas se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de A x B+2 (Condo y Pazmiño, 2015). Bajo este diseño experimental e incluyendo dos testigos, se generaron 11 tratamientos y por cada tratamiento se efectuaron tres repeticiones, dando así un total de 33 unidades experimentales.

4.2.5. Unidad experimental

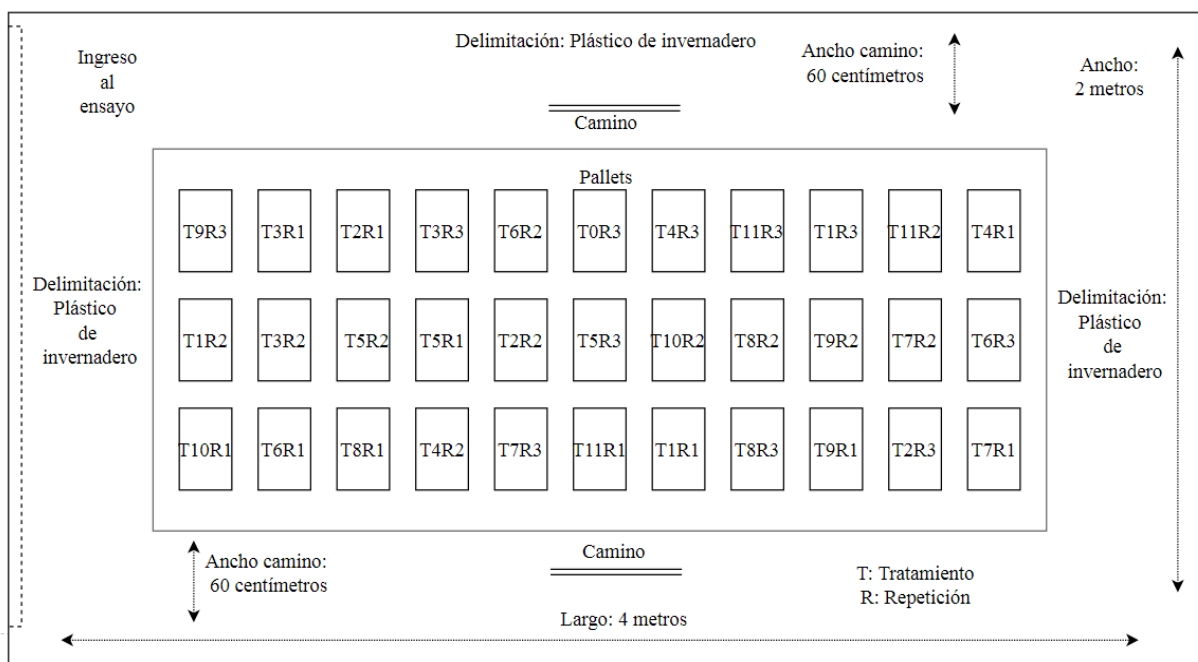
La unidad experimental está representada por una bolsa agrícola de polietileno color negro, misma que contiene aproximadamente 8 kg de suelo proveniente de una parcela de pasto ubicada en la localidad de Huaca de la provincia del Carchi, también cuenta con una bandeja plástica, y una planta de fréjol de la variedad I-481-Rojo del valle.

4.2.6. Parcela neta

El área total asignada en el invernadero de la granja experimental de la ECAA para el ensayo, contó con 4 metros de largo, 2 metros de ancho y un área total de 8 m², se dejó un espaciamiento de 60 cm a los lados para el manejo del cultivo. Cada unidad experimental fue centrada en un área de 0,18 m² y distribuida de acuerdo al diseño completamente al azar.

Figura 2

Distribución de las unidades experimentales en el ensayo.



4.2.7. Factores en estudio

Las variables independientes o factores que se estudiaron en el experimento y que podrían influir en las variables de respuesta fueron momentos de aplicación del inóculo fúngico y la concentración del mismo. Para cada factor se probó tres niveles los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8

Factores de estudio y niveles

Factor A	Niveles
Momentos de aplicación	M1 Durante la siembra (Casbis y Villegas, 2016)
	M2 15 Días después de la siembra (Casbis y Villegas, 2016)
	M3 Previo a la floración o 45 días de cultivo (Martínez et al., 2008)
Factor B	Niveles
Concentración	C1 1×10^9 UFC/ml (León, 2020)
	C2 1×10^8 UFC/ml (Souchie et al., 2010)
	C3 1×10^7 UFC/ml (Cabrera et al., 2016)

4.2.8. Tratamientos

Los tratamientos evaluados, consistieron en la combinación de niveles de los dos factores de estudio: A) momentos de aplicación con tres niveles (M1= Durante la siembra; M2= 15 después de la siembra; M3= previo a la floración o a los 45 días de cultivo) y B) concentración del inóculo con tres niveles (C1= 1×10^9 UFC/ml; C2= 1×10^8 UFC/ml; C3= 1×10^7 UFC/ml). Adicionalmente se consideró dos testigos que corresponden a un testigo absoluto (Sin aplicación de ningún fertilizante) y un testigo convencional (Fertilización fosforada efectuada por el agricultor). Los tratamientos resultantes se detallan en la (Tabla 9).

Tabla 9*Esquema de los tratamientos aplicados en la investigación*

Código	Interacción A x B	Descripción
T1	M1 C1	Durante la siembra en concentración 1×10^9 UFC/ml
T2	M1 C2	Durante la siembra en concentración 1×10^8 UFC/ml
T3	M1 C3	Durante la siembra en concentración 1×10^7 UFC/ml
T4	M2 C1	15 Días después de la siembra en concentración 1×10^9 UFC/ml
T5	M2 C2	15 Días después de la siembra en concentración 1×10^8 UFC/ml
T6	M2 C3	15 Días después de la siembra en concentración 1×10^7 UFC/ml
T7	M3 C1	Previo a la floración (o 45 días) en concentración 1×10^9 UFC/ml
T8	M3 C2	Previo a la floración (o 45 días) en concentración 1×10^8 UFC/ml
T9	M3 C3	Previo a la floración (o 45 días) en concentración 1×10^7 UFC/ml
T10		Testigo absoluto (Sin aplicación)
T11		Testigo convencional (Aplicación de fertilizante fosforado)

4.2.9. Variables

4.2.9.1. Variables independientes

Momentos de aplicación

La fertilización adecuada de fósforo suele hacerse por parte de los agricultores de forma fraccionada, esto debido a que los cultivos tienen una mayor demanda de este nutriente en momentos específicos a lo largo de su ciclo. En este sentido, para verificar que la aplicación

del inóculo fúngico puede suplir los requerimientos de fósforo en cada uno de estos momentos más demandantes o en alguno de ellos y por tanto se puede reemplazar al fertilizante químico, se realizó una única aplicación de biofertilizante a la siembra, 15 días después de la siembra, y previo a la floración. Los primeros momentos se realizó con el fin de favorecer el desarrollo radicular (Casbis y Villegas, 2016). El tercer momento se realizó previo a la floración para mejorar el desarrollo, rendimiento y calidad del grano (Martínez et al., 2008).

Concentración del inóculo

Para aumentar la población de microorganismos solubilizadores de fósforo del suelo a emplear y por ende aumentar la disponibilidad de este nutriente para que pueda ser tomado por las plantas según su requerimiento en cada momento específico, se consideró para el inóculo fúngico una concentración referencial de 1×10^8 UFC/ml tal y como lo propone Souchie et al., (2010), la cual ha sido probada directamente al sustrato, sobre el sistema radicular de la planta, en las bases de plántulas y en semillas en varias investigaciones (Cabral et al., 2012; Arias et al., 2019), y a partir de esta concentración considerada como la ideal, se tomó una concentración más concentrada y una menos concentrada.

4.2.9.2. Variables dependientes

Las variables agronómicas evaluadas fueron algunos parámetros de rendimiento del cultivo de fréjol, más el fósforo disponible del suelo de cada tratamiento. Estas variables son:

- **Número de vainas por planta**

Se realizó mediante el conteo de forma visual al momento de la cosecha en seco (100 días del cultivo), cuando se contabilizó el número de vainas totales formadas en cada planta de fréjol o tratamiento y posteriormente se registró la cantidad (Narváez et al., 2011).

- **Números de granos por vaina**

Para esto se tomaron todas las vainas formadas en las plantas de cada tratamiento, se desgranaron manualmente, se mezclaron para luego contar el total de granos y se dividió para

el número de vainas para así obtener el promedio del número de granos por vaina (Narváez et al., 2011).

- **Rendimiento**

Efectuando el desgrane de las vainas, se registró el peso de los granos en una balanza analítica de cada tratamiento respectivamente y se transformó en kilogramos por hectárea (Checa et al., 2011).

- **Longitud de la raíz**

De forma cuidadosa se desmontó todas las plantas de las bolsas plásticas, se retiró los terrones de suelo adheridos y enseguida se extendieron sobre una superficie horizontal para localizar de mejor manera el cuello de la raíz en el cual se colocó el metro y se midió hasta el extremo más distal de la raíz de la planta (Camargo y Ávila, 2014).

- **Fósforo disponible del suelo**

Se realizó en la al laboratorio de análisis de suelos y aguas de la estación experimental Santa Catalina del INIAP, por el método desarrollado por Olsen con una solución de bicarbonato sódico (NaHCO_3), 0,5 M, tal como lo describe (Andrades et al., 2015).

4.2.10. Alcance del primer objetivo específico

Para cumplir con el primer objetivo específico planteado en la investigación, el cual está establecido como “determinar el mejor momento y concentración de aplicación de *Aspergillus niger* P., como hongo solubilizador de fósforo que favorece el desarrollo y rendimiento del cultivo de fréjol de acuerdo a su ciclo fenológico”, se procedió con los siguientes métodos que se describen a continuación.

4.2.10.1. Reactivación del hongo *Aspergillus niger*

La colonia fúngica a base de *Aspergillus niger* P., fue proporcionada por el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, la cual fue obtenida, secuenciada e identificada inicialmente en la investigación de la tesis doctoral del Ph.D Diego Manuel León Tapia cuyo tema es “Biodiversidad microbiana y almacenamiento de carbono

en suelos con distinto uso en la provincia del Carchi (República de Ecuador)”, y a partir de esta investigación fue conservada bajo refrigeración en cajas petri con medio de cultivo (León, 2020). De esta se cortó un fragmento mediante un bisturí estéril y se sembró bajo condiciones de asepsia en 3 tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo y se dejó por tres días en incubación a 28 °C (Mafla, S. comunicación personal 26 de marzo 2022). Posteriormente se tomaron alícuotas de 5 µL de cada tubo y se colocaron en 3 cajas petri con 20 ml de medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar) y se incubaron en posición invertida a 28 °C por cinco días. Las colonias desarrolladas se seleccionaron y se repitió el procedimiento de siembra en placas Petri con PDA, hasta lograr la purificación de la cepa fúngica (Villalba et al., 2018; León, 2020).

4.2.10.2. Identificación macroscópica y microscópica

La cepa se identificó en base a los principales rasgos morfológicos de las colonias formadas, considerando las características macroscópicas observadas a simple vista tales como color, forma y tipo de colonia, además se observó las estructuras microscópicas más importantes que fueron analizadas bajo microscopio como esporas, cabeza conidial y conidióforo (Villalba et al., 2018). Para la identificación microscópica de este hongo filamentoso se tomó una muestra de micelio de la caja petri con ayuda de un asa micológica, misma que se colocó sobre un portaobjetos, se agregó una gota de agua destilada y se homogeneizó la muestra con la ayuda de otra asa, posteriormente se colocó el cubreobjetos encima y se procedió a observar en el microscopio hasta el lente objetivo 40x (Rojas, 2011).

4.2.10.3. Evaluación cualitativa de solubilización de fósforo por la cepa

Índice de solubilización (IS)

Una vez purificada e identificada la cepa solubilizadora de fósforo, se procedió a medir el índice de solubilización. Para esto se inoculó la cepa en 3 cajas de Petri con 20 ml de cultivo sólido Pikovskaya modificado (ver anexo 4) en el cual la fuente de fósforo es el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y transcurridos 3 y 5 días se midió el diámetro del halo claro presente alrededor de la colonia, el diámetro de la colonia y se observó su crecimiento hasta el día 10. Cada uno de estos diámetros se midieron desde el centro de la colonia (Romero y Mendoza,

2019; León, 2020). Los valores obtenidos fueron promediados y considerados en la siguiente fórmula:

$$IS = [\text{Diámetro de la colonia (mm)} + \text{Diámetro del halo (mm)}] / \text{Diámetro de la colonia (mm)}$$

(Mahamuni et al., 2012; Doilom et al., 2020)

% Eficiencia de Solubilización (ES)

Luego se midió el % de Eficiencia de Solubilización Relativa (ESR), para lo cual se restó al diámetro del halo de solubilización el diámetro de la colonia, obteniendo así la zona de solubilización y se sustituyó este valor en la siguiente fórmula:

$$\% ES = (\text{Zona de solubilización} / \text{Diámetro de la colonia}) * 100$$

(Singh y Prakash, 2012; Jyothi y Basaiah, 2020)

4.2.10.4. Preparación de los inóculos fúngicos

El hongo aislado fue sembrado en 10 cajas de petri que contenían PDA como medio de cultivo y se incubaron a 28 °C durante siete días a partir de los cuales se procedió a realizar cuidadosamente el raspado de esporas y el lavado de cajas con agua destilada esterilizada a temperatura ambiente (Villalba et al., 2018; León, 2020). A partir de la suspensión madre de esporas resultante, se efectuaron diluciones para obtener tres inóculos fúngicos con diferentes concentraciones (1×10^9 , 1×10^8 y 1×10^7 UFC/ml). Para verificar la concentración de los inóculos, se agitó la muestra a contabilizar para que tenga una distribución homogénea y se tomó 1 ml de la muestra con una micropipeta, luego se llenó la cuadrícula de la cámara de Neubauer con el cubreobjetos ya puesto hasta un volumen suficiente, posteriormente se montó la cámara de Neubauer con la muestra en un microscopio compuesto, se procedió a localizar y a enfocar la cuadrícula con el lente objetivo de 40x. Finalmente se realizó el conteo de esporas tal como lo propone (Arredondo y Voltolina, 2014) y cada inóculo obtenido en laboratorio se mezcló con una suspensión que contenía un 40% de goma arábiga y una solución de azúcar al 10 % (Kaur y Reddy, 2016). Todo este proceso se realizó para la primera biofertilización y se repitió en las siguientes aplicaciones.

4.2.10.5. Adecuación del espacio en el invernadero para el cultivo

Se efectuó de forma manual con ayuda de una azadilla y machete la limpieza de toda la maleza presente en el sitio de experimentación (Invernadero de la granja experimental de la ECAA) y sus alrededores para posteriormente recoger con un rastrillo de tipo abanico los residuos vegetales mismos que se llevaron a una compostera fuera del área experimental. Esto se efectuó con la finalidad de evitar aspectos indeseables provocados por la maleza al propagarse y generar una competencia con el cultivo de interés por agua, radiación solar, nutrientes, además de ser posibles hospedantes de plagas o patógenos que pudieran afectar al cultivo haciendo que este reduzca su tasa de crecimiento y por tanto interfiera en el rendimiento al momento de la cosecha (Esperbent, 2015).

Posteriormente, se levantó una infraestructura de madera de 3,40 m de alto y se procedió a cerrar el espacio con plástico de invernadero con el fin de evitar la entrada de plagas o enfermedades preexistentes en los cultivos aledaños (rosas y cartuchos) y además impedir la contaminación química durante las labores de fumigación que se realizaban en estos dos cultivos. Finalmente, se niveló el sitio y se acomodó una serie de pallets, para evitar que los tratamientos se encontraran en contacto con el suelo, y por ende pudieran contaminarse con agentes dañinos con mayor facilidad.

4.2.10.6. Recolección, preparación del suelo y llenado de bolsas

La toma de la muestra fue realizada en una parcela de pasto cuya ubicación geográfica es de latitud $00^{\circ}37'22''$, longitud $77^{\circ}42'29''$ y altitud de 2 923 m.s.n.m., en la provincia del Carchi, cantón San Pedro de Huaca y sector Guananguicho norte. Una de las razones que se consideró para emplear el suelo de este lugar, es que este lugar se describió como una zona con una alta fijación de fósforo, posiblemente debido a la presencia de alófanos e imogolita y al complejo aluminio-humus que presenta este suelo, de tipo andosoles predominantes en esta provincia (Yanggen et al., 2003 como se citó en León, 2020). Además, teniendo en cuenta que el hongo *Aspergillus niger* P., fue aislado inicialmente de esta zona del Carchi, fue otra razón para utilizar el suelo de este lugar, ya que se debe considerar un determinado biofertilizante para un suelo específico, para así proporcionar las condiciones que favorezcan el crecimiento del inoculante de forma que se disminuya la pérdida de los microorganismos

aplicados por la no adaptación y por competencia con otros microorganismos nativos de un suelo distinto (Armenta et al., 2010; Restrepo et al., 2017).

Es así que el suelo de este lugar fue recolectado en sacos quintaleros a una misma profundidad de 15 a 20 cm, luego fue transportado al sitio experimental en donde fue extendido sobre un plástico con el fin de reducir el exceso de humedad. Con la finalidad de homogeneizar enseguida fue mezclado y posteriormente fue tamizado en una malla metálica con espaciamentos de 5 x 5 mm para facilitar el retiro de la maleza, restos vegetales y terrones hasta obtener un suelo completamente mullido que facilitó la germinación de las semillas (Vera et al., 2017). Posteriormente, se empleó bolsas agrícolas plásticas de color negro, perforadas en los laterales y en el fondo para favorecer el escurrimiento del excedente de agua, mismo que se almacenó en las bandejas agrícolas que se ubicaron debajo de cada bolsa a las cuales se les incorporó aproximadamente 8 kg de suelo tamizado en capas, procurando evitar espacios vacíos en el interior y presionando periódicamente a medida que se adicionó cada capa de suelo. Al culminar el llenado, se dejó espacio libre en el borde con el fin de que cuando se riegue, el agua penetre fácilmente sin desbordarse (Instituto Nacional Tecnológico [INT], 2018).

4.2.10.7. Selección de semillas

Se seleccionó semilla procedente de la estación Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). La semilla proporcionada fue de la variedad I-481 Rojo del valle, la cual presenta una buena adaptación en localidades del valle del Chota (Carchi, Imbabura), Pallatanga (Chimborazo), Chillanes (Bolívar). Además, se optó por esta variedad debido a que presenta resistencia genética a enfermedades tales como roya, pudrición de raíz y plagas como el lorito verde y trips (Peralta et al., 2014).

4.2.10.8. Desinfección de semillas

Las semillas de fréjol seleccionadas, se desinfectaron superficialmente sumergiéndose en etanol al 95 % durante tres minutos e hipoclorito de sodio al 3 % durante cinco minutos, y luego se lavaron con agua destilada esterilizada (Kaur y Reddy, 2016; León, 2020).

4.2.10.9. Inoculación fúngica

Para la biofertilización a la siembra se sumergieron las semillas de fréjol en la suspensión del inóculo fúngico respectivamente (Kaur y Reddy, 2016). Posteriormente se transfirieron a bandejas plásticas mismas que se cubrieron de la luz solar y calor hasta transportarlas al sitio de experimentación (invernadero) para su siembra en las bolsas. Las siguientes aplicaciones a los 15 días y previo a la floración (45 días), se realizaron directamente al suelo y cerca del sistema radicular de la planta mediante una micropipeta con la cual se distribuyó 10 ml de inóculo de forma homogénea (Chávez et al., 2020).

4.2.10.10. Labores culturales en el cultivo de fréjol

La siembra se realizó con el suelo húmedo mediante pinzas esterilizadas a una profundidad de dos centímetros y vigilando que la radícula se encuentre ubicada hacia abajo para que así todas las plantas mantuvieran un crecimiento homogéneo. Se emplearon 3 semillas por sitio tal como lo recomienda Peralta et al., (2013) mismas que fueron depositadas en el centro de cada bolsa según el tratamiento, luego fueron cubiertas con suelo y se presionó levemente la superficie, con el fin de evitar la entrada de aire que pudiera afectar la germinación de las semillas. Una vez que lograron emerger se realizó el raleo dejando las plantas más homogéneas. Posteriormente se realizó la fertilización química fosforada de forma manual, en dosis bajas debido a que el suelo presentó alta disponibilidad de nutrientes según los análisis efectuados por el INIAP (anexo 13). En este sentido, la cantidad empleada se realizó de acuerdo a los requerimientos del cultivo y análisis de suelo con niveles altos, únicamente en los testigos convencionales, en los cuales se depositó cierta cantidad de roca fosfórica como fuente de fósforo a cinco centímetros de distancia del sitio de siembra y a una profundidad de cinco centímetros. Esto se realizó para evitar quemar la semilla por contacto directo con el fertilizante químico (Martínez et al., 2008).

Tabla 10*Recomendación de fertilización de fréjol arbustivo.*

Análisis de suelo	N	P2O5	K2O	S
	(Kg/ha)			
Bajo	20-40	60-80	40-60	15-20
Medio	10-20	40-60	20-40	10-15
Alto	0-10	20-40	0-20	0-10

Nota: Adaptado de Peralta et al., (2013)

En cuanto al riego, este se efectuó con una regadera en cada una de las unidades experimentales con agua destilada esterilizada, a una frecuencia de dos veces por semana o cada vez que la planta lo necesitaba para mantener un nivel óptimo de humedad. Además, se hizo énfasis durante la floración y llenado de vainas, pero cuidando de no causar encharcamiento o ambientes húmedos propicios para el desarrollo de enfermedades (Peralta et al., 2013; León, 2020). El control de la maleza durante el ensayo se efectuó periódicamente de forma manual con especial atención a los 15 y 45 días después de la siembra (Peralta et al., 2013). Además, el retiro de la maleza se realizó tanto de las bolsas (unidades experimentales) como la de los alrededores para evitar su propagación hasta el cultivo de interés.

4.2.10.11. Evaluación de las variables agronómicas

Para evaluar las variables agronómicas como el número de vainas, número de granos, rendimiento y longitud de la raíz. se tomó en cuenta los días transcurridos a partir de la siembra hasta que las plantas expresaron características de madurez fisiológica completa para la cosecha en seco (100 días), es decir cuando las plantas ya no pueden absorber nutrientes del suelo para seguir creciendo, están completamente defoliadas o la mayoría de hojas se han caído, las vainas cambian de color verde a color amarillo y de igual manera el grano ya ha

alcanzado el mayor tamaño, peso y empiezan a secarse (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2009; Peralta et al., 2013).

4.2.11. Alcance del segundo objetivo específico

Con el fin de dar cumplimiento al segundo objetivo específico en el cuál se propuso “evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo del hongo *Aspergillus niger*, comparando la disponibilidad de este nutriente en el suelo al inicio y al final del experimento.”, se realizó un análisis del suelo colectado inicialmente y un final para cada tratamiento. Además, para corroborar, la presencia del hongo inoculado y su posible influencia en la disponibilidad de fósforo en el suelo se volvió a realizar el aislamiento del suelo de los tratamientos. Los procedimientos seguidos para cada análisis, se describen a continuación.

4.2.11.1. Análisis de suelo inicial

Se inició con la toma de la muestra de suelo, la cual fue realizada en la misma parcela de pasto en la provincia del Carchi, donde se recolectó el suelo empleado en el experimento. Para esto se procedió a delimitar la parcela pasto y para conformar una muestra compuesta se tomó una serie de 10 submuestras mediante un azadón con el que se quitó la cobertura vegetal y se recogió el suelo a una profundidad de 15 a 20 cm en el área de la rizósfera. Cada sub muestra se tomó en sitios distribuidos uniformemente aplicando el método de zig-zag debido a que se contó con un terreno plano. Durante el muestreo también se consideró lo siguiente: 1) Verificación de que el lote no haya sido fertilizado o encalado recientemente 2) descarte de sitios próximos a los caminos, cercas, lugares pantanosos y sitios con acumulaciones de estiércol, 3) Retiro de la cobertura vegetal y piedras en el sitio de muestreo antes de cada colecta, 4) Herramientas limpias y bolsas sin ningún contaminante químico, 5) Muestreo uniforme en profundidad, 6) Retiro de terrones, raíces y residuos vegetales, y 7) Uso de guantes desechables durante la recolección para evitar la contaminación de la muestra (Okavayashi, 2010; Andrades et al., 2014; Mendoza et al., 2017).

Las sub muestras colectadas de cada sitio de muestreo fueron depositadas enseguida en una bolsa plástica limpia y se mezclaron con el fin de homogeneizar todo el suelo colectado. Una vez que se logró homogeneizar el suelo se extrajo una cantidad de 500 g para obtener así una

muestra compuesta representativa del terreno. Dado que la muestra fue recolectada en época lluviosa, se procedió a secar las muestras al aire libre bajo sombra por más de 12 horas. Finalmente, se empacó la muestra, se identificó con una etiqueta y fue transportada al laboratorio de análisis de suelos y aguas de la estación experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) para el análisis químico de la muestra (Okavayashi, 2010; Mendoza et al., 2017). El pH se midió utilizando el método del potenciómetro con una solución de suelo y agua a una relación de 1:2,5. El nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), se cuantificó mediante la técnica Olsen Modificado (Olsen et al., 1954).

4.2.11.2. Análisis de suelo final

Transcurridos los 100 días del cultivo bajo invernadero, se procedió a realizar la toma de las muestras de suelo de cada tratamiento. Para esto, se formaron 11 muestras compuestas con las repeticiones de cada tratamiento respectivamente, en los que se recolectó cuidadosamente el suelo rizosférico a una profundidad de 15 a 20 cm. El suelo colectado se depositó en bolsas plásticas limpias, previamente etiquetadas según el tratamiento, se homogeneizó y se procedió a pesar 1 kg de cada muestra (Andrades et al., 2014). Finalizado este proceso, se empacó enseguida en una caja de cartón las 11 muestras para ser enviadas al laboratorio de análisis de suelos y aguas de la estación experimental Santa Catalina del INIAP, en el que se analizó únicamente el fósforo disponible por el método de Olsen.

4.2.11.3. Monitoreo de la presencia del HSP en los tratamientos

Para corroborar la presencia del hongo inoculado, se realizó al final de ensayo nuevamente el aislamiento, para esto se muestreo aproximadamente 250 g de suelo rizosférico de cada tratamiento y enseguida de estas se tomó una porción la cual se pasó por un tamiz de 0,5 mm y se pesó 1 gramo de suelo que se suspendió en 50 ml de agua destilada esterilizada, posteriormente se agitaron durante 15 minutos las muestras, y por último se tomó una alícuota de 1 ml de esta suspensión y se sembró en cajas de petri con 20 ml medio de cultivo pikovskaya e incubadas por 48 horas a 28 °C (León, 2020).

CAPÍTULO V

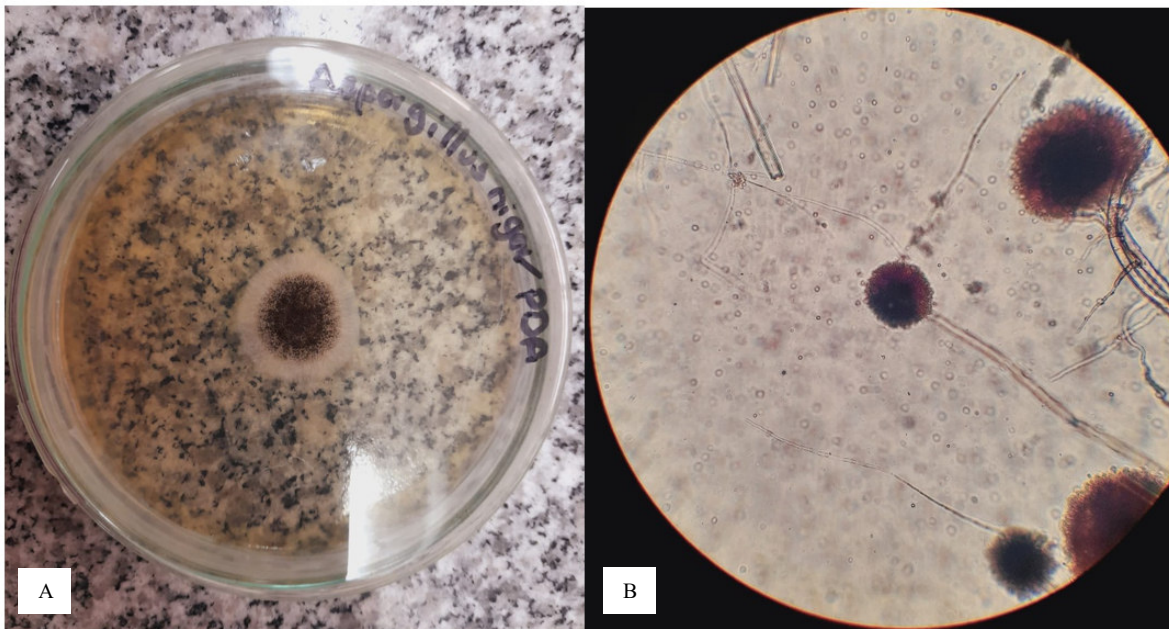
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Reactivación e identificación del hongo *Aspergillus niger*

Según las características macroscópicas de las colonias del hongo de tipo filamentoso en PDA después de cinco días de crecimiento, presento un micelio blanco entre las primeras 24 a 48 h de cultivo, volviéndose negro, aspecto granuloso, polvoriento y reverso amarillo en los siguientes días, mientras que las características microscópicas fueron cabezas conidiales de tipo globosas, de color negro a café, conidióforos de aspecto liso de color hialino a café claro y las esporas o conidios se mostraron en forma de globos lisos de color hialino a café claro. Las características previamente mencionadas coinciden para el hongo filamentoso *Aspergillus niger* P., (Villalba et al., 2018).

Figura 3

Identificación del hongo reactivado en PDA



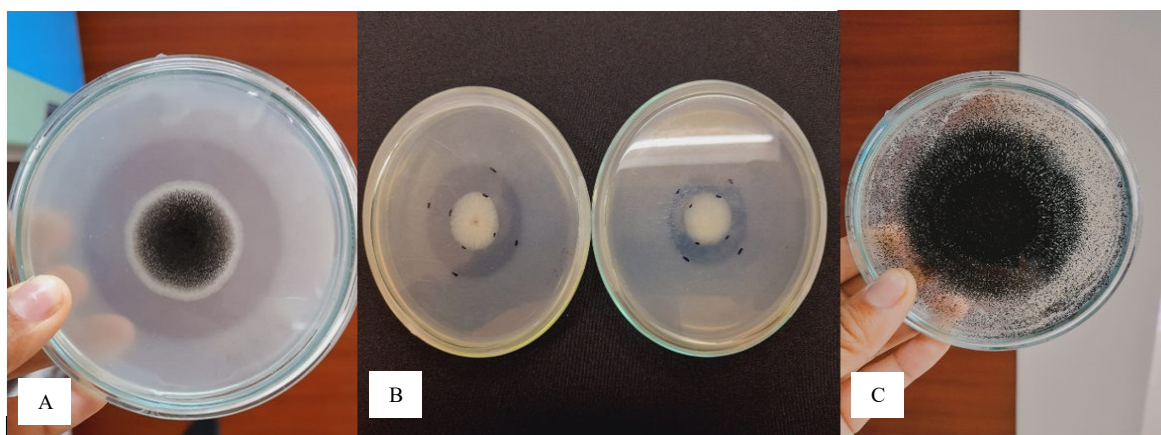
Nota: A) Crecimiento del hongo *Aspergillus niger* P., en medio de cultivo PDA a 28 °C y transcurridas 24 horas a partir de la siembra B) Observación microscópica de las estructuras del hongo bajo microscopio compuesto con lente objetivo 40x.

5.2. Evaluación de la eficiencia e índice de solubilización de fósforo *in vitro*

La cepa fúngica de *Aspergillus niger* P., creció en el medio de cultivo Pikovskaya modificado en todas las cajas de petri cultivadas. La presencia de un halo translúcido o de color hialino alrededor de las colonias de cada una de las cajas indicó cualitativamente la solubilización de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) por parte de este hongo, mismo que se observó desde 24 horas de incubación e incrementó con el tiempo hasta el tercer y quinto día en los que se midió el halo de solubilización, mientras que para el décimo día el halo translúcido no fue visible debido a que el hongo ocupó mayor volumen de la caja al continuar con su crecimiento.

Figura 4

Actividad solubilizadora del hongo en el medio de cultivo Pikovskaya



Nota: **A)** Solubilización de fosfato tricálcico por parte del hongo a los 5 días de incubación **B)** Medición por el reverso de las cajas de petri los halos de solubilización o zonas hialinas generadas por el hongo **C)** Crecimiento del hongo a los 10 días de incubación en la caja de petri.

Los resultados cualitativos obtenidos para el Índice de Solubilización (IS) en el día 3 de incubación se mantuvieron en un rango de 1,70 a 1,90 mientras que para el día 5 de incubación se registraron datos dentro de un rango de 2 a 2,08. Por otra parte, los resultados obtenidos para el porcentaje de Eficiencia de Solubilización (% ES) en el día 3 se mantuvo en un rango de 70 a 90 % y para el día 5 de 100 a 108 %. Los promedios obtenidos tanto para el IS como para el % ES se muestran en la (Tabla 11).

Tabla 11

Promedio del IS y % ES del hongo a los 3 y 5 días de cultivo.

Día	Diámetro de la colonia + zona de solubilización (mm)	Diámetro de la colonia (mm)	Zona de solubilización (mm)	IS	% ES
3	36,75	20,5	16,25	1,79	79 %
5	52,75	25,75	27	2,05	105 %

El índice de solubilización (IS) en promedio se asemeja a los resultados obtenidos en investigaciones similares realizadas por Suárez et al., (2019), cuando se constató que el índice de solubilización de varias cepas de *Aspergillus* spp. fue variable y alcanzó un valor máximo de 2,41 y un mínimo de 1,87 mostrando así resultados positivos en ensayos *in vitro*. De igual forma, se comparó con investigaciones realizadas por Romero et al., (2019) donde al evaluar diferentes hongos solubilizadores de fósforo, los valores de los índices de solubilización estuvieron dentro de un rango de 2,06 a 6,85 y destacaron los aislados de *Penicillium* sp. así como también los de *Aspergillus* sp. Por otra parte al comparar el porcentaje de eficiencia de solubilización (% ES), el valor promedio obtenido en esta investigación es muy aproximado a los resultados que obtuvieron Brito y Ulla (2012) de 110,5 % por hongos del género *Aspergillus*. Esta capacidad solubilizadora de fósforo por parte de la cepa empleada perteneciente al género *Aspergillus*, está relacionada con la habilidad para producir ácidos orgánicos como ácido cítrico, glucónico, glicólico, oxálico, y succínico, los cuales producen el descenso del pH y actúan como quelantes o secuestradores de iones de aluminio, calcio, hierro y magnesio con los que el fósforo generalmente forma compuestos insolubles. Además, los hongos de este género pueden solubilizar el fósforo de diferentes fuentes de roca fosfatada, aunque cabe mencionar que, dado que pueden también comportarse como patógenos en determinadas circunstancias y sobre ciertos cultivos, su uso ha sido muy limitado (Romero et al., 2019).

5.3. Evaluación de las variables dependientes

5.3.1. Prueba de normalidad y homogeneidad de la varianza

Obtenidos los resultados de las variables dependientes se realizó para cada una de estas variables la prueba de normalidad mediante el test de Shapiro – wilk, con la cual se obtuvo los valores de *p-value* mismos que se compararon con el valor alfa de 0,05. Las variables que presentaron valores de *p-value* mayores a 0,05 mostraron una distribución normal de los datos. De igual forma los datos de cada variable se procesaron por medio de la prueba de Levene con la cual al obtener valores de *p-value* mayores a 0,05 se demostró la prueba de homogeneidad de la varianza de los tratamientos. Al cumplir con estos dos supuestos necesarios, se procedió a realizar el análisis ADEVA, mientras que aquellos datos que no cumplieron con estos dos supuestos se transformaron mediante raíz cuadrada, raíz cuadrada +1 y \log_{10} para conseguir una distribución normal de los datos y si aun así tampoco cumplieron con los supuestos mencionados se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal - Wallis.

Tabla 12

Pruebas de normalidad y homogeneidad para las variables dependientes.

Variables	N°	Media	Desviación estándar	W*	Shapiro test	p - value	Transformación \sqrt{x}	P-valor	Transformación $\sqrt{x+1}$	P-valor	Transformación Log 10	Levene test	Homogeneidad	p - value
Rendimiento	33	858,20	21,36	0,95	0,333							0,1521		
Número de vainas por planta	33	7,94	0,58	0,92	0,0715							0,0592		
Número de granos por vaina	33	4	0,44	0,51	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
Longitud de raíz	33	56,47	3,78	0,94	0,274							0,8824		

Nota: Shapiro-Wilk test p-value >0,05: los datos provienen de distribución normal; p-value <0,05: los datos no provienen de distribución normal.

5.3.1. Rendimiento

Efectuado el análisis de varianza ADEVA se obtuvieron diferencias altamente significativas en los tratamientos, para el factor momento, en la interacción de los dos factores momento y dosis, así como también entre el testigo absoluto y el testigo convencional. En cuanto al factor dosis y al comparar los dos testigos versus el resto de tratamientos no se encontraron diferencias significativas. Además, se obtuvo un coeficiente bajo de variación del 3 % el cual muestra homogeneidad de los datos de la variable rendimiento.

Tabla 13

Análisis de varianza para la variable rendimiento.

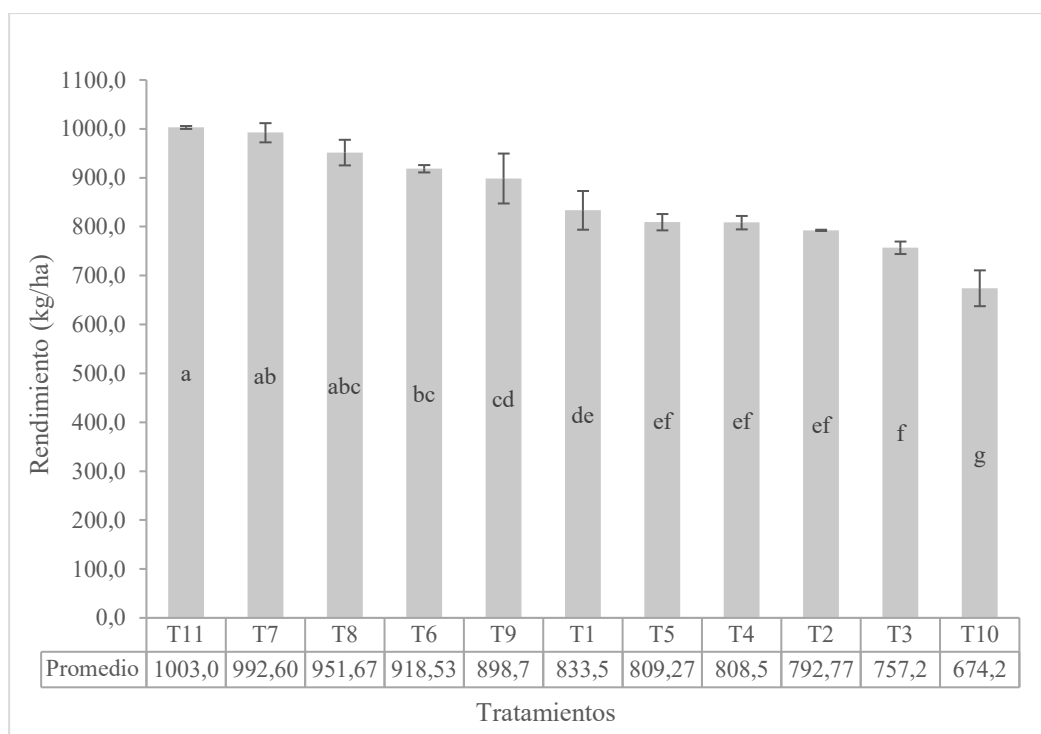
FV	GL	CM	F cal	p-valor	Significancia
Repetición	2	2067,72	0,19	0,8301	ns
Tratamientos	10	32055,09	48,31	<0,0001	***
Momento	2	54757,12	83,28	<0,0001	***
Dosis	2	1765,78	2,69	0,0953	ns
Momento*Dosis	4	10639,91	16,18	<0,0001	***
t1 y t2 vs resto	1	2814,13	4,24	0,0515	ns
t1 vs t2	1	162131,28	244,32	<0,0001	***
Error	22	663,6			
Total	32				
CV	3%				
Promedio	858,20				

Nota: F.V: Fuentes de variación, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F cal: valor F calculado, CV: Coeficiente de variación, *: Diferencia significativa, **: Diferencia altamente significativa, ns: no existe diferencia significativa* Diferencia significativa (p<0,05); ** Diferencia medianamente significativa (p<0,01); *** Diferencia altamente significativa (p<0,0001); ns No existe diferencia significativa (p>0,05).

Dadas las diferencias significativas encontradas, se realizó la prueba de Tukey al 5 % para los tratamientos con lo cual se pudo comparar los rangos de significancia y las medias. Con esto se obtuvo que las plantas correspondientes al T11 (Testigo convencional) con rango (a) consiguieron los más altos rendimientos de 1003 kg/ha, mientras que las plantas pertenecientes al T10 (testigo absoluto) con rango (g) presentaron un menor rendimiento de 674 kg/ha. Por otra parte, respecto a los tratamientos inoculados se pudo evidenciar que T7 se comporta de forma similar al T11 por lo que sigue manteniendo un alto rendimiento de 992,60 kg/ha, mientras que el menos efectivo fue el T3 con rango (f) cuyo rendimiento fue de 757,2 kg/ha, pero difiere del T10.

Figura 5

Prueba de Tukey al 5% para la variable rendimiento.



Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). T1= Durante la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T2= Durante la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T3 = Durante la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T4= 15 Días después de la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T5= 15 Días después de la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T6= 15 Días después de la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T7= Previo a la floración a 1×10^9 UFC/ml; T8= Previo a la floración a 1×10^8 UFC/ml; T9= Previo a la floración a 1×10^7 UFC/ml; T10= Testigo absoluto; T11=Testigo convencional.

Por otra parte, al comparar los momentos de inoculación se obtuvo que el mejor momento de inoculación fue previo a la floración (figura 6) el cual corresponde al rango (a) con un rendimiento de 947,66 kg/ha y el momento menos efectivo fue a la siembra que se encuentra en el rango (c) con un rendimiento de 794,49 kg/ha. En cuanto a las dosis no se encontró significancias estadísticas, sin embargo, al comparar los promedios se observa que los mejores rendimientos se obtuvieron con la dosis más alta de 1×10^9 UFC/ml (figura 7). En cuanto a la interacción de los dos factores momento y dosis, se encontró que los mejores resultados fueron en las plantas que se inocularon previo a la floración con la dosis más alta de 1×10^9 UFC/ml, y los resultados más bajos fueron en las plantas que se inocularon a la siembra en la dosis más baja de 1×10^7 UFC/ml.

Figura 6

Prueba de Tukey al 5 % para el rendimiento en relación al momento de inoculación.

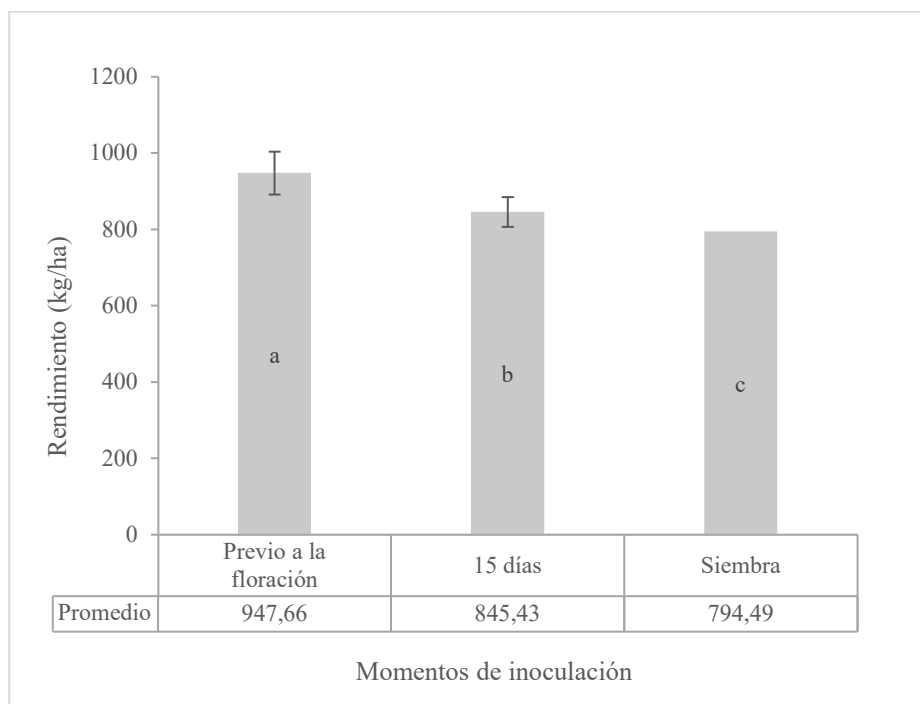
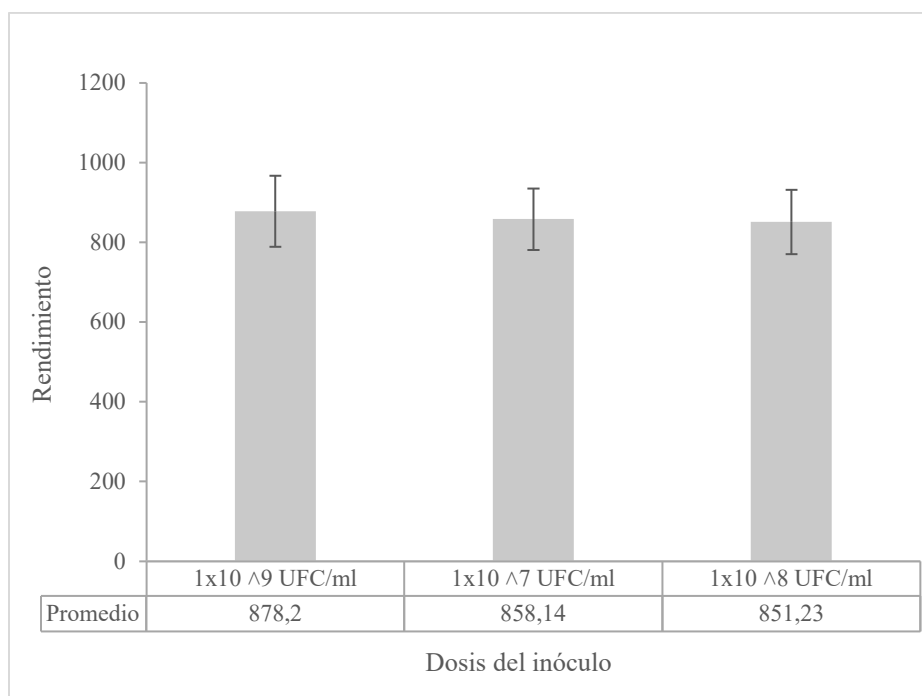


Figura 7

Promedios para rendimientos en relación a la dosis del inóculo fúngico



El aumento del rendimiento en los tratamientos que fueron inoculados, se le atribuye a la acción del hongo que fue aplicado, el cual ha mostrado una gran capacidad de solubilización de fósforo tanto *in vitro* como en sustrato al aumentar la disponibilidad de este nutriente (Romero, 2018; Suárez et al., 2019) y en el caso del testigo convencional a la incorporación de fósforo mediante el fertilizante químico. Por otra parte, el rendimiento alto obtenido en los tratamientos que fueron inoculados previo a la floración, posiblemente fue debido a que el fréjol no únicamente sustrae gran cantidad de fósforo del suelo en las primeras etapas de su ciclo fenológico, sino que también lo requiere en grandes cantidades previo o durante la floración para favorecer el buen desarrollo, mejorar el rendimiento, la calidad y la formación del grano (Martínez et al., 2008; Munera, 2012). En cuanto al testigo absoluto, el rendimiento pudo verse afectado debido a que una baja disponibilidad de este nutriente en el suelo ocasiona el retraso en la floración, madurez fisiológica y una deficiente formación de órganos reproductivos (Quintana et al., 2017), mientras que en el tratamiento 3 pudo haber presentado un bajo rendimiento en comparación con el resto de los tratamientos inoculados probablemente debido a que se empleó la menor dosis y fue perdiéndose los microorganismos más fácilmente poco a poco durante el ciclo del cultivo de fréjol hasta estabilizarse con la

población microbiana existente en el suelo, la cual generalmente se sitúa en una concentración de 10^4 por gramo de suelo (Chávez et al., 2020).

Por otra parte, si bien se conoce que tanto *in vitro* como en invernadero el hongo *Aspergillus niger* P., presenta una actividad solubilizadora de fósforo inorgánico a través de su capacidad de producción de ácidos orgánicos (Acosta et al., 2019), los estudios sobre su efecto en momentos específicos especialmente a los 15 días de cultivo y previo a la floración son limitados para comparar con los resultados obtenidos. Sin embargo, Albuquerque y Velásquez (2008) mencionan que debido a que en las últimas décadas se ha generado una tendencia al uso de enmiendas alternativas, se han reportado investigaciones en las que se ha empleado este hongo como inóculo fúngico principalmente en semillas para la siembra o en la zona rizosférica al momento del trasplante de plántulas. En este sentido, se han informado resultados positivos en plantas de cafeto en la fase de vivero por la aplicación de enmiendas biológicas a $\sim 2 \times 10^7$ conidios/ml promueven el crecimiento de las plantas, principalmente las procedentes de semilla botánica (Acosta et al., 2019), asimismo se ha observado que los hongos solubilizadores de fósforo *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus niger* P., aislados de una granja orgánica, mejoran el rendimiento del maíz y el trigo junto con la fertilización con roca fosfórica (Kaur y Reddy, 2016), de igual forma, en estudios realizados por Romero (2018) en plantas de jitomate bajo invernadero, se ha observado que al aplicar al transplante el inóculo fúngico a base de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. con una concentración de 1×10^8 UFC/ml directamente en la zona de la rizósfera y al sustrato se expresa un efecto beneficioso en el número de flores y racimos como indicativo del rendimiento de las plantas de jitomate.

5.3.2. Número de vainas por planta

De acuerdo con el análisis de ADEVA respecto al número de vainas producidas por cada planta de fréjol de la variedad I-481 Rojo del valle, se demuestra que existen estadísticamente diferencias altamente significativas en tratamientos y en el testigo absoluto versus el testigo convencional, una leve significancia en el factor momento, y de igual forma en la interacción de los dos factores momento y dosis. Respecto al factor dosis y en los dos testigos versus el resto de tratamientos no se encontraron diferencias significativas. En cuanto al coeficiente de variación este fue de 8,77 % lo cual demuestra homogeneidad de los datos para esta variable.

Tabla 14*Análisis de varianza para la variable número de vainas por planta.*

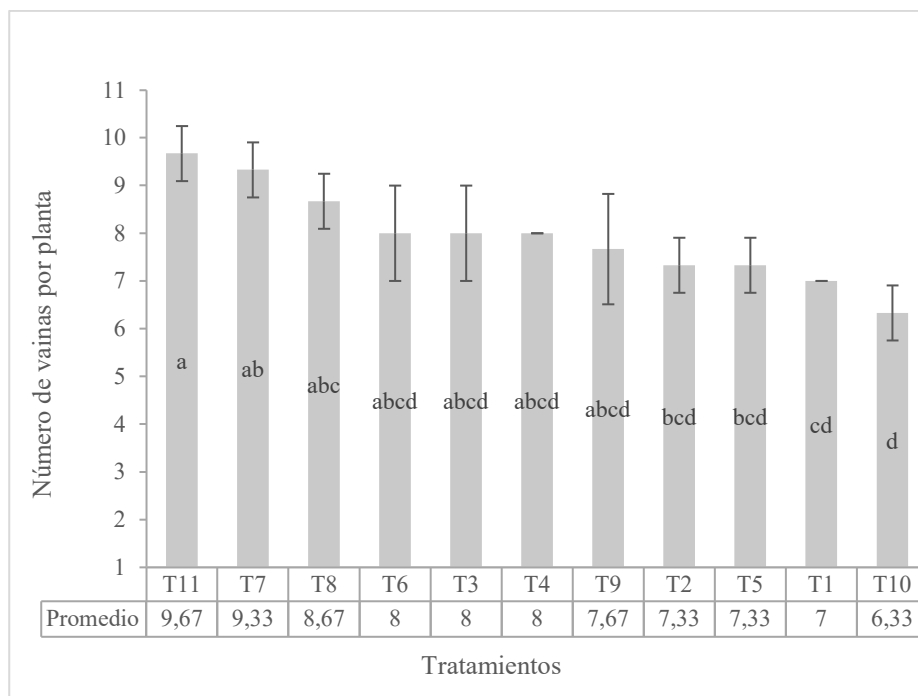
FV	GL	CM	F cal	p-valor	Significancia
Repetición	2	0,04	0,04	0,9601	ns
Tratamientos	10	2,92	6,02	0,0002	***
Momento	2	2,93	5,64	0,0125	*
Dosis	2	0,26	0,5	0,6147	ns
Momento*Dosis	4	1,54	2,96	0,0481	*
t1 y t2 vs resto	1	0,03	0,06	0,8158	ns
t1 vs t2	1	16,67	34,38	<0,0001	***
Error	22	0,48			
Total	32				
CV	8.77				
Promedio	7.94				

Nota: F.V: Fuentes de variación, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F cal: valor F calculado, CV: Coeficiente de variación, * Diferencia significativa ($p < 0,05$); ** Diferencia medianamente significativa ($p < 0,01$); *** Diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$); ns No existe diferencia significativa ($p > 0,05$).

Al haber encontrado diferencias significativas, fue necesario aplicar la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos, con lo cual se pudo comparar los rangos de significancia y las medias. A través de esta prueba se obtuvo que el T11 (testigo convencional) con rango (a) fue el mejor ya que presentó el mayor número de vainas de 9,67 mientras que el T10 (testigo absoluto) con rango (d) mostró un bajo número de vainas de 6,33. Por otro lado, en cuanto a los tratamientos inoculados se encontró que T7 se comporta de la misma manera que T11, en cuanto a los tratamientos T6, T3, T4, T9 estos no son significativamente diferentes, y el menos efectivo fue el T1 el cual presentó 7 vainas y tiende a comportarse de forma similar que el testigo absoluto.

Figura 8

Prueba de Tukey al 5 % para la variable vainas por planta



Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). T1= Durante la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T2= Durante la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T3 = Durante la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T4= 15 Días después de la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T5= 15 Días después de la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T6= 15 Días después de la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T7= Previo a la floración a 1×10^9 UFC/ml; T8= Previo a la floración a 1×10^8 UFC/ml; T9= Previo a la floración a 1×10^7 UFC/ml; T10= Testigo absoluto; T11=Testigo convencional.

Con lo que respecta a los momentos de inoculación se registró el mayor número de vainas de 8,86 en los tratamientos que fueron inoculados previo a la floración con rango (a) y el menor número de vainas de 7,44 al momento de la siembra con rango (b) (figura 9), además se encontró que cuando se inoculó a los 15 días después siembra los resultados tienden a ser similares a los que se obtuvo cuando se inoculó previo a la floración. Para las dosis empleadas, no se encontraron significancias estadísticas por lo que se compararon los promedios con lo cual se obtuvo que la dosis más alta de 1×10^9 UFC/ml muestra un número de vainas un tanto mayor que con las otras dosis (figura 10). También se encontró que en la

interacción dosis momento, hubo una significancia para el momento previo a la floración en la dosis más alta de 1×10^9 UFC/ml y el peor fue a la siembra en la dosis más alta, mientras que el resto no presenta diferencias significativas.

Figura 9

Prueba de Tukey al 5 % para el número de vainas en relación al momento de inoculación.

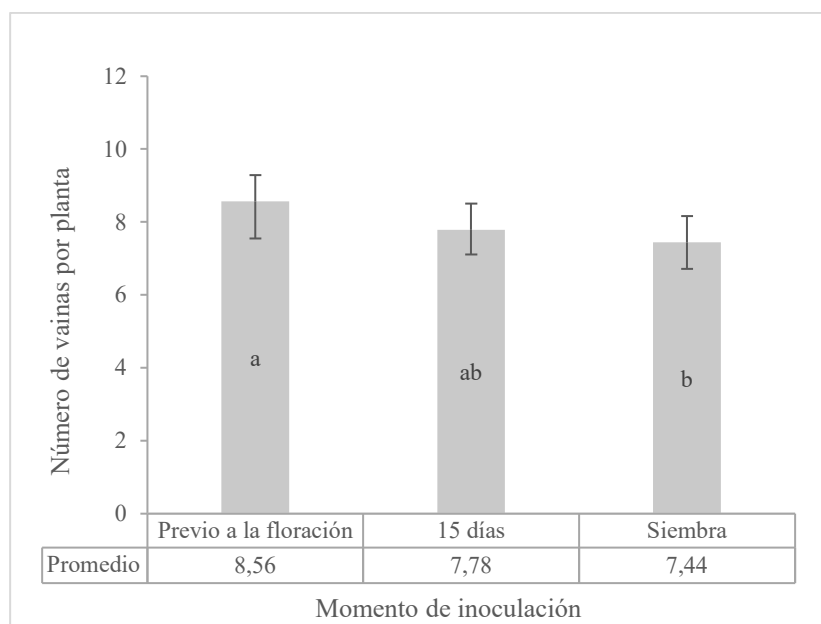
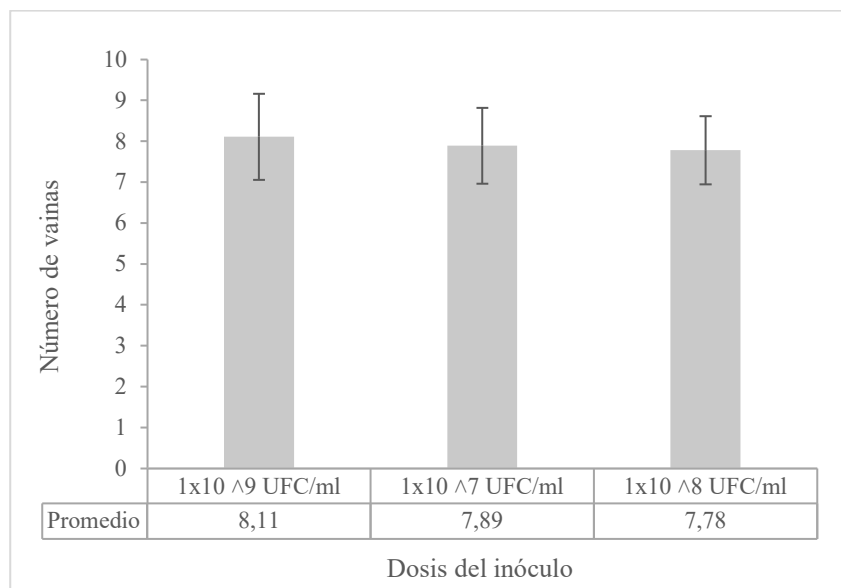


Figura 10

Promedios para el número de vainas en relación a la dosis del inóculo



Los resultados positivos obtenidos en el tratamiento 11 (testigo convencional) pudo deberse a la roca fosfórica adicionada y en los tratamientos inoculados especialmente en el caso del tratamiento 7 seguido del tratamiento 8 y en los demás tratamientos se le atribuye a la habilidad de solubilización de fósforo inorgánico por el hongo *Aspergillus niger* P., el cual al aumentar el fósforo disponible en el suelo, este nutriente podría ingresar al interior de las raíces donde puede almacenarse y transportarse a las partes superiores a través de diversas reacciones químicas en las que se incorpora a distintos compuestos orgánicos y mediante estas formas el fósforo puede movilizarse por toda la planta donde está disponible para otras reacciones necesarias (Avellán et al., 2020). Debido a este desplazamiento de este nutriente por toda la planta, provoca efectos positivos incrementando la acumulación de masa seca de raíces, en tallos, en hojas, en peciolos y en vainas, mientras que una condición de deficiencia de fósforo afecta el crecimiento radicular, lo que a su vez causa una reducción de crecimiento de todas las partes superiores de la planta (Casbis y Villegas, 2016). Por otro lado, los mejores resultados encontrados en el número de vainas en los tratamientos que fueron inoculados previo a la floración puede ser atribuido a que la aplicación de fósforo cuando el cultivo de fréjol se encuentra en floración y llenado de vaina, favorece su buen desarrollo y por tanto mejora el rendimiento y aunque se considera que en estas etapas es importante suministrar los nutrientes vía foliar, este no desplaza a la fertilización tradicional del cultivo (Martinez et al., 2008).

En investigaciones similares realizadas por Celia (2017) demostraron que al inocular distintas cepas solubilizadoras de fósforo a una concentración de 32×10^7 UFC/ml con distintos niveles de fósforo y en tipos de suelo en semillas de fréjol se han obtenido incrementos en el número de vainas producidas. También se ha demostrado que la aplicación de fósforo como fertilizante en el cultivo de fréjol aumenta el número de vainas en comparación con el testigo. En este sentido, un aumento en el número de vainas por planta aumenta la productividad ya que a menudo esta variable muestra una mayor y más consistente correlación con el rendimiento (Quintana et al., 2017).

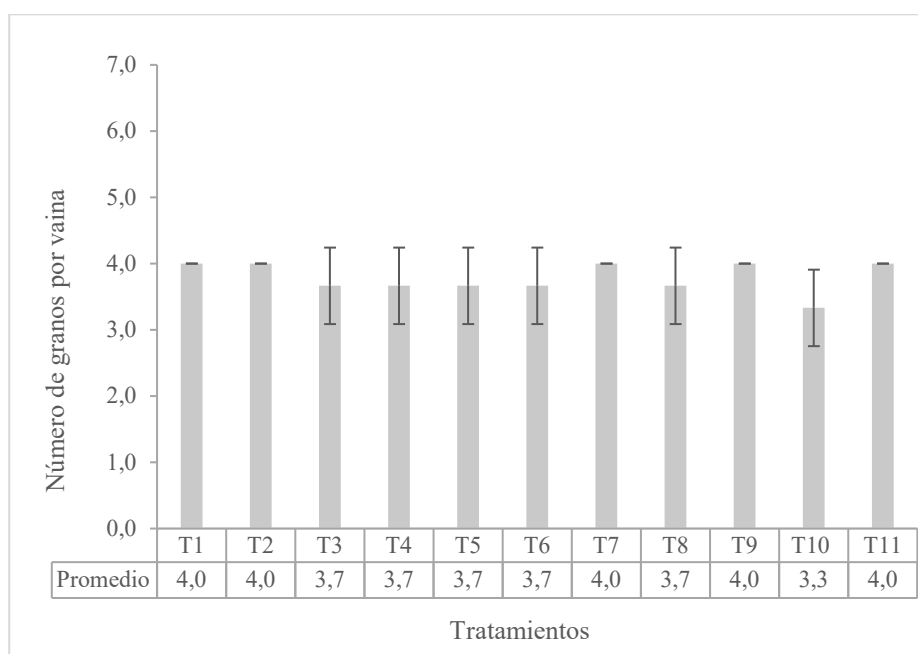
5.3.3. Números de granos por vaina

Dado que no se cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad, el análisis de la varianza se realizó por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal –Wallis con la cual se

obtuvo un valor de p-value de 0,552, valor que es mayor al valor alfa de 0,05, por lo que se concluyó que no existen estadísticamente diferencias significativas. El valor del coeficiente de variación obtenido fue de 11,26 % el cual muestra homogeneidad de los datos de esta variable. Además, se obtuvo un promedio de 3,79 granos por vaina.

Figura 11

Comparación del número de granos por vaina obtenidos en los distintos tratamientos.



Nota: T1= Durante la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T2= Durante la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T3 = Durante la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T4= 15 Días después de la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T5= 15 Días después de la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T6= 15 Días después de la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T7= Previo a la floración a 1×10^9 UFC/ml; T8= Previo a la floración a 1×10^8 UFC/ml; T9= Previo a la floración a 1×10^7 UFC/ml; T10= Testigo absoluto; T11=Testigo convencional.

En la figura 11, se observa que respecto al número de granos por vaina no existe estadísticamente diferencias significativas en los tratamientos, esto posiblemente debido a considerando que el número de granos se ve influenciado por la genética de la variedad de fréjol empleada. Sin embargo, pese a que no se encontraron diferencias significativas, si se puede apreciar una diferencia matemática entre todos los tratamientos respecto al testigo

absoluto al cuál no se le aplicó fertilizante químico ni biofertilizante en ningún momento, lo que pudo haberse dado debido a que el fósforo es vital para la formación de semillas y para mejorar la calidad de los granos (Martinez et al., 2008; Munera, 2012).

5.3.4. Longitud de la raíz

Una vez realizado el análisis de ADEVA referente a la longitud de la raíz, este expresó que existen diferencias altamente significativas para tratamientos, en la interacción de los dos factores y en los dos testigos versus el resto de tratamientos. En cuanto al factor momento, se encontró que existen diferencias significativas, mientras que para el factor dosis y al comparar el testigo convencional versus el testigo absoluto no se encontraron diferencias significativas. En cuanto al coeficiente de variación este fue de 8.08 % lo cual expresa homogeneidad de los datos para la variable longitud de la raíz. Además, se obtuvo un promedio de 56.47 cm.

Tabla 15

Análisis de varianza para la variable longitud de raíz.

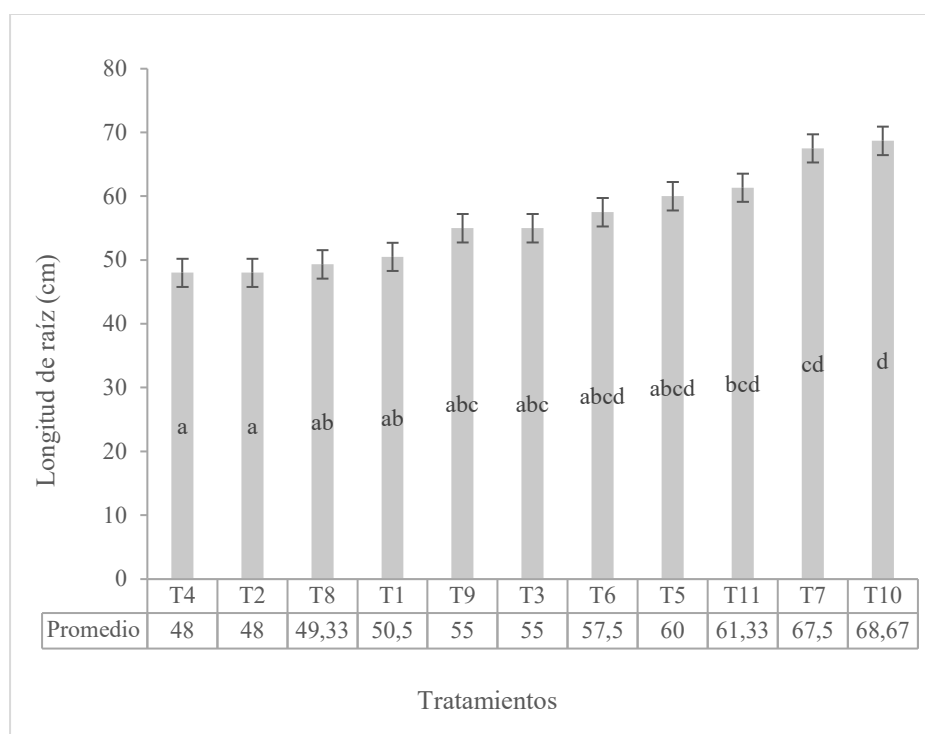
FV	GL	CM	F cal	p-valor	Significancia
Repetición	2	3,4	0,06	0,9437	ns
Tratamientos	10	162,59	7,82	<0,0001	***
Momento	2	86,7	3,86	0,0402	*
Dosis	2	30,12	1,34	0,2864	ns
Momento*Dosis	4	193,54	8,62	0,0005	***
t1 y t2 vs resto	1	537,42	25,84	<0,0001	***
t1 vs t2	1	80,67	3,88	0,0616	ns
Error	22	20,8			
Total	32				
CV	8.08				
Promedio	56.47				

Nota: F.V: Fuentes de variación, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F cal: valor F calculado, CV: Coeficiente de variación, * Diferencia significativa ($p < 0,05$); ** Diferencia medianamente significativa ($p < 0,01$); *** Diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$); ns No existe diferencia significativa ($p > 0,05$).

Al haber esta significancia se realizó la prueba de Tukey al 5 % para los tratamientos, con lo que se obtuvo el T10 (testigo absoluto) con rango (d) presentó una mayor elongación radicular de 68,67 cm, mientras que los tratamientos T4 y T2 los cuales se encuentran en el rango (a) mostraron la menor elongación de raíz de 48 cm, es decir, se comportan de manera similar. El T7 mostró una gran elongación radicular de 67,5 cm y de igual forma lo hizo el T11 el cual presentó una elongación de 61,33 cm.

Figura 12

Prueba de Tukey al 5 % para la variable longitud de la raíz.



Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). T1= Durante la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T2= Durante la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T3 = Durante la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T4= 15 Días después de la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T5= 15 Días después de la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T6= 15 Días después de la siembra a 1×10^7

UFC/ml; T7= Previo a la floración a 1×10^9 UFC/ml; T8= Previo a la floración a 1×10^8 UFC/ml; T9= Previo a la floración a 1×10^7 UFC/ml; T10= Testigo absoluto; T11=Testigo convencional.

Con lo que respecta a los momentos de inoculación se registró la mayor longitud de la raíz fue 57,28 cm que corresponde a los tratamientos que fueron inoculados previo a la floración con rango (b) y una menor longitud de 51,17 cm al momento de la siembra con rango (a) (figura 13), mientras que la inoculación a los 15 días con rango (ab) expresó efectos similares a la inoculación previo a la floración. Para las dosis del inóculo empleado, no se encontraron significancias estadísticas por lo que se compararon los promedios con lo cual se obtuvo un máximo de 55.83 cm para la dosis de 1×10^7 UFC/ml y un mínimo de 52.44cm 1×10^8 , lo cual muestra que en relación a las dosis no existe mucha variabilidad (figura 10). También se encontró que en la interacción dosis momento, hubo una significancia para los tratamientos T4, T2, T8 y T1 los cuales obtuvieron una menor longitud, mientras que los que alcanzaron una mayor longitud de la raíz fue en el tratamiento 7 el cual fue inoculado a los 45 días en la dosis más alta.

Figura 13

Prueba de Tukey al 5 % para la longitud de la raíz en relación al momento de inoculación.

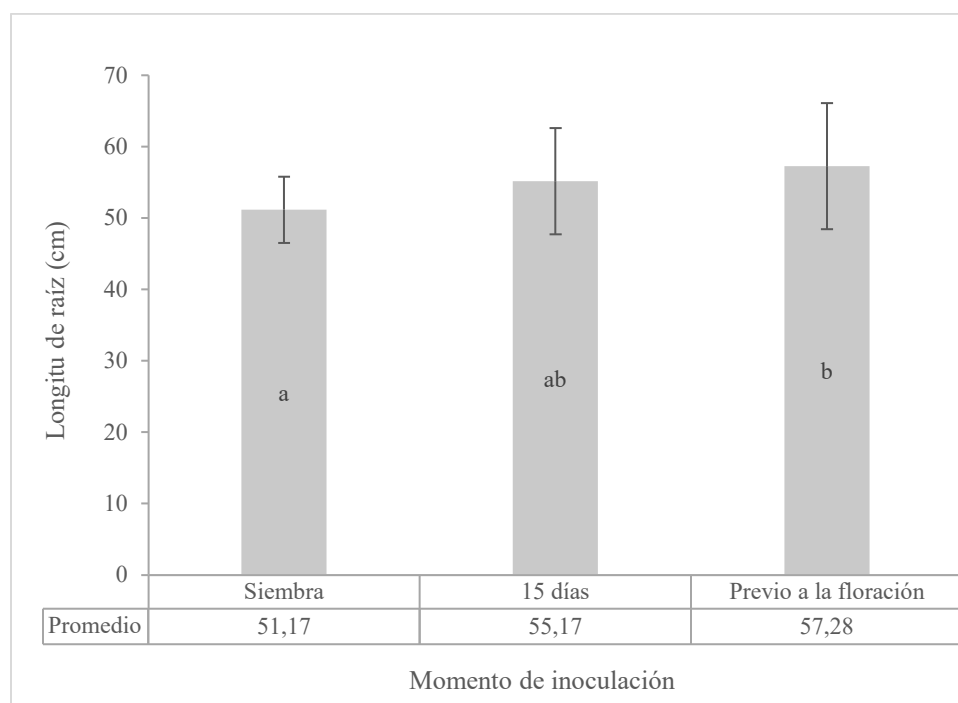
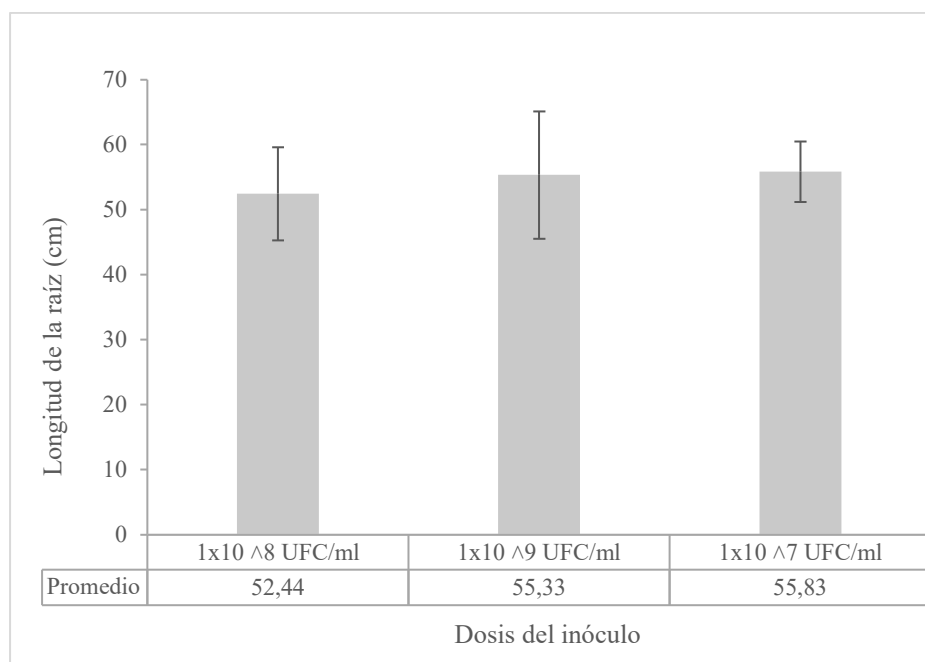


Figura 14

Comparación de la longitud de la raíz en relación a la dosis del inóculo.



La mayor longitud de raíces en el testigo absoluto al que no se le aplicó el inóculo fúngico ni tampoco fertilizante químico mostró mayor elongación radicular, posiblemente debido a que se considera que cuando el suelo muestra poca disponibilidad de nutrientes, las raíces se extienden en busca de nutrientes, por otra parte, los valores menores de la longitud radicular en los tratamientos que fueron inoculados con el hongo *Aspergillus niger* P., puede ser debido a que este hongo aplicado proporcionó mayor concentración de nutrientes en la rizósfera de tal forma que las plantas encontraron este nutriente de forma directa y por ende no fue necesario extender su sistema radicular (Barea et al., 2008 como se citó en Arias et al., 2019). De igual forma Vargas y Castro (2019), mencionan que los suelos con deficiencias nutricionales se correlacionan con un aumento en el crecimiento de raíces de las plantas, y en el caso específico de las deficiencias de fósforo, las plantas presentan un aumento de la longitud de raíces y producen raíces más finas, esto con el objetivo de aumentar el área superficial radical, para de este modo mejorar la adquisición de fósforo del suelo. Por otra parte, según investigaciones indican que los efectos de la inoculación con hongos solubilizadores en cultivos hortícolas están más relacionados con un aumento ramificaciones radicales al estimular el crecimiento de pelos radicales a través de la producción de

fitohormonas, o la alteración de la membrana de la raíz y el flujo de salida de iones (Richardson y Simpson, 2011 como se citó en Romero, 2018).

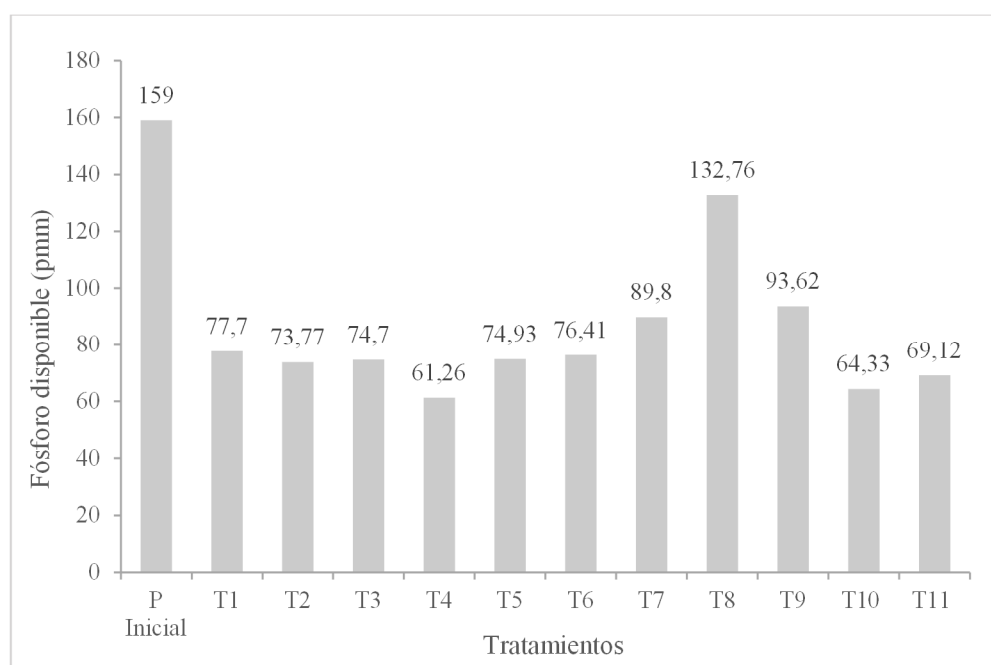
Este efecto de aumento encontrado sobre la longitud radicular en los tratamientos inoculados, se asemejan con los estudios realizados por Romero (2018) en donde se probaron diferentes especies de hongos en consorcios, y como resultados se obtuvo que en los testigos alcanzaron una mayor elongación radicular respecto a los tratamientos inoculados con hongos solubilizadores de fósforo.

5.3.5. Fósforo disponible de los tratamientos

Los resultados obtenidos en cuanto al fósforo disponible inicial del suelo empleado y el fósforo disponible final en el suelo rizosférico de las plantas de fréjol inoculadas y no inoculadas luego de 100 días de cultivo se muestran en la siguiente figura.

Figura 15

Fósforo disponible inicial y en el suelo rizosférico de los tratamientos al final del cultivo.



Nota: P inicial= fósforo disponible inicial; T1= Durante la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T2= Durante la siembra a 1×10^8 UFC/ml; T3 = Durante la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T4= 15 Días después de la siembra a 1×10^9 UFC/ml; T5= 15 Días después de la siembra a 1×10^8 UFC/ml;

T6= 15 Días después de la siembra a 1×10^7 UFC/ml; T7= Previo a la floración a 1×10^9 UFC/ml; T8= Previo a la floración a 1×10^8 UFC/ml; T9= Previo a la floración a 1×10^7 UFC/ml; T10= Testigo absoluto; T11= Testigo convencional.

Según los resultados de los análisis de suelo proporcionados por el INIAP, mostró un alto contenido de fósforo disponible inicial en el suelo empleado para los distintos tratamientos, y luego de 100 días de cultivo en todos los tratamientos incluyendo a los testigos se redujo tras la absorción efectuada por las plantas de fréjol las cuales toman el fósforo preferentemente como ion orto fosfato primario (H_2PO_4^-) en suelos con un pH inferior a 7 (Quintana et al., 2017).

Por otra parte, al comparar el fósforo disponible final entre los tratamientos, los resultados fueron prometedores, ya que la mayoría de los tratamientos que fueron inoculados con la cepa fúngica de *Aspergillus niger* P., mostraron mayor cantidad de fósforo disponible respecto al testigo convencional y al testigo absoluto. Este efecto positivo se evidenció especialmente en los tratamientos que fueron inoculados previo a la floración (T7, T8 y T9) los cuales obtuvieron la mayor cantidad de fósforo disponible, mientras que los tratamientos que fueron inoculados a la siembra y a los 15 días obtuvieron una menor cantidad de fósforo disponible, lo cual se le atribuye al tiempo transcurrido en el cual las plantas absorbieron este nutriente, y además considerando que debido a que el propósito de esta investigación fue probar momentos no se realizaron reinoculaciones como lo recomienda Restrepo (2007) quien señala que es importante realizar un mayor número de aplicaciones de biofertilizantes con intervalos bien cortos, pero al no efectuarlo posiblemente la población microbiana inoculada a la siembra y a los 15 días se redujo debido a que en algún momento pudieron estar sometidos a algún tipo de estrés y por ende la población restante fue la encargada del ciclaje de nutrientes entre estos el fósforo (Chávez et al., 2020).

El incremento promedio de fósforo disponible final en los tratamientos inoculados respecto a los testigos en promedio fue de un 34.8 % lo cual es un tanto menor a los resultados obtenidos en estudios similares donde se midió el fósforo disponible en el sustrato empleado al cuál se le adicionaron distintas fuentes de fósforo sintéticos fosfatados y alcanzaron un incremento respecto al testigo del 51.23% de fósforo en plantas de soya con *Aspergillus niger* P., (Chakraborty et al., 2010 como se citó en Romero, 2018) y de igual manera con estudios

en los que obtuvo un incremento del 63.08 % con una cepa *Aspergillus niger* P., (Wang et al., 2014 como se citó en Romero, 2018). Sin embargo, en la presente investigación al ser inoculado en suelo, se tiene un efecto positivo de solubilización del fósforo por parte del microorganismo empleado en esta investigación, por lo cual puede ser considerado para usarlo como enmienda microbiana fosfórica para facilitar la liberación de fósforo retenido en el suelo o para incrementar de forma ecológica la eficiencia del uso de fósforo sintético empleado en los sistemas agrícolas (Kaur y Reddy, 2015 como se citó en Vargas y Castro, 2019).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- La cepa fúngica de *Aspergillus niger* P., en el presente estudio expresó una respuesta positiva de crecimiento al ser reactivada en el medio de cultivo PDA, manteniendo tanto sus características macroscópicas como microscópicas propias de esta especie.
- De acuerdo a la evaluación cualitativa *in vitro* se evidenció una alta capacidad de solubilización de fósforo en el medio de cultivo pikovskaya luego de cinco días de incubación.
- En base a los resultados de las variables de estudio, se determinó que, a nivel de invernadero, el hongo *Aspergillus niger* P., al ser aplicado como biofertilizante fosfórico previo a la floración (o 45 días) del cultivo de frejol de la variedad I-481 Rojo del valle y a una concentración de 1×10^9 UFC/ml, puede causar efectos similares a la fertilización química, favoreciendo la formación de vainas y por tanto llevando a un aumento del rendimiento.
- La inoculación del hongo *Aspergillus niger* P., en la siembra demuestra que al mejorar la disponibilidad del fósforo en el suelo evita que, durante las primeras etapas del cultivo, la longitud de la raíz tenga que extenderse en busca de nutrientes para suplir con sus requerimientos.
- Además, se determinó mediante el análisis de suelo que la inoculación de *Aspergillus niger* P., puede aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo.
- Dado que la población de *Aspergillus niger* P., posiblemente puede reducirse con el tiempo, es importante que se aplique periódicamente tomando en cuenta el estado fenológico del cultivo y los momentos más demandantes de este.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se sugiere desarrollar investigaciones similares en campo con la finalidad de verificar su eficacia aun estando en condiciones no controladas, y que de este modo se pueda ver la posibilidad de poder aplicar este tipo de alternativas ecológicas en ambientes en los que se desenvuelven comúnmente los agricultores.
- En próximos experimentos, se sugiere optar por la evaluación de consorcios entre cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP) con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), ya que por un lado los MSP solubilizan el fósforo adsorbido a los coloides de la arcilla, mientras que los HMA aumentan la absorción y traslocación hacia las plantas. En este sentido, posiblemente se pueden obtener mejores resultados de crecimiento y desarrollo de las plantas con una inoculación combinada con estos organismos comparado con una sola inoculación (Cabral et al., 2012). De igual manera, se recomienda el uso consorcios de microorganismos que no solo faciliten la disponibilidad del fósforo, sino que a su vez permitan la captura de otros nutrientes indispensable para las plantas como el nitrógeno el cual tiende a volatilizarse en forma de amoniaco o del potasio el cual al igual que el fósforo tiende a fijarse en el suelo.
- También se considera importante realizar estudios del microorganismo empleado en esta investigación con otros cultivos de interés socioeconómico y probar otras dosis.
- Por último, dado que en el presente trabajo se determinó que la cepa de *Aspergillus niger* P., empleada presentó una buena capacidad de solubilización y mostró efectos positivos cuando fue inoculada, se recomienda aplicarla como biofertilizante en el cultivo de fréjol (I-481 Rojo del Valle) hasta el momento de floración y en cuanto a la dosis se sugiere aplicarlo en dosis altas.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M., Cruz, M., Pichardo, T., Rodríguez, E., Barbón, R., Capote, A., Pérez, A., y Alvarado, Y. (2019). Solubilización de fosfatos in vitro por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* y promoción del crecimiento de plantas de café. *Bioteología Vegetal*, 19(1), 65-72. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2021Z00006>
- Afanador, L. (Agosto de 2017). Biofertilizantes: conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*, 2(1), 66-76. <https://www.researchgate.net/publication/331454557>
- Alburquerque, B., y Velásquez, G. (2008). Cinética de liberación del fósforo en roca fosfórica. *Revista Cubana de Química*, 20(3), 13-16. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543715002>
- Andrades, M., y Martínez, E. (2014). *Fertilidad del suelo y parámetros que la definen*. España: Universidad de la Rioja.
- Andrades, M., Moliner, A., y Masaguer, A. (2015). *Prácticas de Edafología : métodos didácticos para análisis de suelos*. Universidad de La Rioja. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=580696>
- Arias, R., Romero, A., Trejo, J., y Elizondo, Y. (2019). Inoculación de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas arbusculares en plantas de jitomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1747-1757. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v10n8/2007-0934-remexca-10-08-1747.pdf>
- Armenta, A., García, C., Camacho, J., Apodaca, M., Gerardo, L., y Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46112896007>
- Arredondo, B., y Voltolina, D. (2014). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalga*, 21-29. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Avellán, L., Cobeña, N., Estévez, S., Zamora, P., Vivas, J., González, I., y Sánchez, A. (28 de Diciembre de 2020). Exportación y eficiencia del uso de fósforo en plátano ‘barraganete’ (*Musa paradisiaca* L.). *Fitotecnia Mexicana*, 43(1), 25-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.25>

- Azcón, J. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGRAW-HILL. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon..pdf>
- Beltrán, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf>
- Bonadeo, E., Moreno, I., Bongiovanni, M., Marzari, R., y Ganum, M. J. (2017). *Sistema suelo-planta*. UniRío. <http://www.unirioeditora.com.ar/wp-content/uploads/2018/08/978-987-688-204-0.pdf>
- Brito, J., y Ulla, E. (2012). Microorganismos solubilizadores de fosfato en dos regiones agroecológicas de la provincia de Tucumán. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 32(1-2), 31-40. <https://www.researchgate.net/publication/259929871>
- Cabral, J., Assis, K., Silva, F., Souchie, E., y Carneiro, M. (2012). Plantas de anacardo del cerrado brasileño inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares y microorganismos solubilizadores de fosfato. *Agrociencia*, 46, 809-821.
- Cabrera, Y., Izquierdo, E., y Baños, Y. (2016). Efectividad y momentos de aplicación del biofertilizante EcoMicâ en la producción de *Solanum lycopersicum* L. var. Mamonal 21. *Revista Científica Avances*, 18(1), 76-84. <http://www.ciget.pinar.cu/ojs/index.php/publicaciones/article/view/152/364>
- Camargo, D., y Ávila, E. (2014). Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura*, 11(1), 91-100. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.19053/01228420.3492>
- Capelle, J. (2011). *Fertilización fosfatada de trigo* [Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica Argentina] <https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/390/1/doc.pdf>
- Casbis, G., y Villegas, Ó. (2016). Importancia de los fosfatos y fosfitos en la nutrición de cultivos. *Acta agrícola y pecuaria*, 55-61.
- Celia, S. (2017). Cepas solubilizadoras del fósforo en el desarrollo del frijol caraota (*Phaseolus vulgaris* L.): <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2924>
- Chávez, I., Zelaya, L., Cruz, C., Rojas, E., Ruíz, S., y Santos, S. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agrobiotecnológica sostenible para

- la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1423-1436. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492>
- Checa, O., Yama, V., y Fuel, S. (2011). Evaluación por componentes de rendimiento de nueve genotipos y un testigo de frijol arbustivo *Phaseolus vulgaris* L. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 73-90.
- Condo, L., y Pazmiño, J. (2015). *Diseño experimental en el desarrollo del conocimiento científico de las ciencias agropecuarias*. Riobamba-Ecuador: ESPOCH. <https://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion-publicaciones/public/docs/books/2019-09-17-214206-dise%C3%B1o%20experimental%20en%20el%20desarrollo%20del%20conocimiento%20cient%C3%ADfico%20de%20las%20ciencias%20agropecuarias-comprimido.pdf>
- Corrales, L., Arévalo, Z., y Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 12(21), 68-79. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n21/v12n21a06.pdf>
- Doilom, M., Wei, J., Phookamsak, R., Mortimer, P., Karunarathna, S., Dong, W., -Fang, C., Pem, D., Suwannarach, N., Promputtha, I., Lumyong, S., y Chu Xu, J. (2020). Screening of Phosphate-Solubilizing Fungi From Air and Soil in Yunnan, China: Four Novel Species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585215>
- Elias, F., Woyessa, D., y Muleta, D. (2016). Phosphate Solubilization Potential of Rhizosphere Fungi Isolated from Plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2016, 2-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/5472601>
- Esperbent, C. (2015). Malezas: el desafío para el agro que viene. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 41(3), 235-240. <https://www.redalyc.org/pdf/864/86443147004.pdf>
- FAO. (2007). *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible*. FAO. <https://www.fao.org/3/y5053s/y5053s.pdf>
- Fernández, M. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(2), 51-57. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223114970009>

- Food and Agriculture Organization. (2018). *More people, more food, worse water? a global review of water pollution from agriculture*. <https://www.fao.org/3/ca0146en/CA0146EN.pdf>
- Garcés, F., Olmedo, I., Garcés, R., y Díaz, T. (2015). Potencial agronómico de 18 líneas de fréjol F6 en Ecuador. *SciELO*, 33(2), 107-118. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292015000200013>
- Grageda, O., Díaz, A., Peña, J., y Vera, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1261-1274. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v3n6/v3n6a15.pdf>
- Hernández, T., Carrión, G., y Heredia, G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 881-892.
- Hernando, R., Sánchez, M., Sieverding, E., Aguilar, K., y Heredia, G. (2012). Relaciones entre los hongos filamentosos y solubilizadores de fosfatos con algunas variables edáficas y el manejo de cafetales. *Revista de Biología Tropical*, 60(3). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442012000300010
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2009). *Guía técnica para el cultivo de frijol en los municipios de Santa Lucía, Teustepe y San Lorenzo del Departamento de Boaco, Nicaragua*. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/19856>
- Jyothi, V., y Basaiah, T. (2020). *Aspergillus carbonarius* as a potential Phosphate solubilizer. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences Paper*, 22(3), 472-478. http://www.envirobiotechjournals.com/article_abstract.php?aid=10828&iid=318&jid=1
- Kaur, G., y Reddy. (2016). Improvement of crop yield by phosphate-solubilizing *Aspergillus* species in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil*, 63(1), 24-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1182161>
- Kehler, A., Haygarth, P., Tamburini, F., y Blackwell, M. (2021). Cycling of reduced phosphorus compounds in soil and potential impacts of climate change. *Special Issue Article*, 72, 2517–2537. <https://doi.org/DOI: 10.1111/ejss.13121>
- León, D. (30 de julio de 2020). *Biodiversidad microbiana y almacenamiento de carbono en suelos con distinto uso en la provincia del Carchi (República del Ecuador)*. [Tesis

doctoral, Universidad de Santiago de Compostela].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=286160>

- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., Hu, Y., Wang, S., y Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. 6(25313).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/srep25313>
- Lina, C., y León, A. (2012). Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos. *Hechos Microbiol*, 3(2), 93-96.
<http://www.udea.edu.co/hm>
- Lougheed, T. (2011). La paradoja del fósforo, escasez y sobreabundancia de un nutriente clave. *salud pública de méxico*, 53(5), 449-455.
- Lozano, P., Hernández, R., Bravo, C., Rivero, C., y Delgado, M. (2012). Disponibilidad de fósforo en un suelo de las sabanas bien drenadas venezolanas, bajo diferentes coberturas y tipos de fertilización. *Interciencia*, 37(11), 820-827.
<https://www.redalyc.org/pdf/339/33925550005.pdf>
- Machado, F. (2017). *Generación de un bioinoculante en base a hongos solubilizadores de fosfato autóctonos a escala de laboratorio* [Tesis de grado, Universidad ORT Uruguay]. <https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/3377>
- Mahamuni, S., Wani, P., y Patil, A. (2012). Isolation of Phosphate Solubilizing Fungi From Rhizosphere of Sugarcane and Sugar Beet Using Tc_p and R_p Solubilization. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 237-244.
<https://www.researchgate.net/publication/230997067>
- Martinez, M., Osuna, E., Padilla, J., Acosta, J., y Loredó, C. (2008). *Tecnología para la producción de frijo en el Norte Centro de México*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-INIFAP.
<http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/783.pdf>
- Mendoza, R., y Espinoza, A. (Agosto de 2017). *Guía muestreo de suelos* [Archivo PDF].
<https://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33M539.pdf>
- Moreno, A. (2007). *Elementos nutritivos. Asimilación, funciones, toxicidad e indisponibilidad en los suelos*.
https://books.google.com.ec/books?id=KAqX9kMkCyEC&printsec=frontcover&hl=es&authuser=0&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=true

- Munera, G. (2012). *El fósforo elemento indispensable para la vida vegetal* [Archivo PDF]. <https://repositorio.utp.edu.co/items/308a10bb-b4cb-43cf-94de-de6650f348b0>
- Muñoz, W. (2016). *Texto básico para profesional en ingeniería forestal. En el área de fisiología vegetal.* IQUITOS. <https://www.unapiquitos.edu.pe/enlinea/pregrado/facultades/forestales/descargas/publicaciones/FISIO-TEX.pdf>
- Navarro, G., y Navarro, S. (2014). *Fertilizantes química y acción.* Mundi-Prensa. <https://books.google.com.ec/books?id=3McUBQAAQBAJ&pg=PA111&dq=fertilizantes+fosforados&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjv6y9u875AhWyZjABHay4BNEQ6AF6BAGHEAI#v=onepage&q=fertilizantes%20fosforados&f=true>
- Okavayashi, Y. (2010). *Prácticas de conservación de suelos y aguas.* JICA.
- Osorio, N. (2009). Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. *Materia orgánica biología del suelo y productividad agrícola*, 43-71. https://doi.org/https://doi.org/10.38141/10791/0003_3
- Patiño, C., y Sanclemente, E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF) una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Unilibre Cali*, 10(2), 288-297. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5473598>
- Peralta, E., Mazón, N., Minchala, L., y Guaman, M. (2013). *Fréjol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) y Arveja (Pisum sativum L.) en las provincias de Cañar, Azuay, y Loja: cultivo, variedades y costos de producción.* Quito/Gualaceo, Ecuador: Estación Experimental Santa Catalina-INIAP.
- Peralta, E., Murillo, A., Mazón, N., y Rodríguez, D. (2014). *Catálogo de variedades mejoradas de fréjol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) para los valles y estribaciones de la Sierra ecuatoriana .* Quito,Ecuador: Estación Experimental Santa Catalina. INIAP.
- Peralta, E., Murillo, N., Mazón, J., y Ernest, E. (Mayo de 2012). *Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos Estación Experimental Santa Catalina-Boletín Divulgativo* N° 313. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/289/4/iniapscbd313.pdf>
- Peralta, E., Murillo, N., Monar, J., Pinzón, y Rivera. (2010). *Manual agrícola de Fréjol y otras Leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción.* (Segunda ed.). Quito, Ecuador: Estación Experimental SantaCatalina. INIAP.

<https://docplayer.es/52714675-Manual-agricola-de-frejol-y-otras-leguminosas-cultivos-variedades-costos-de-produccion.html>

- Peréz, A., Ossa, J., y Montes, D. (2012). Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Colombiana cienc*, 4(1), 35-45.
- Pralhad, K., y Ashokrao, D. (2017). Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 6(1), 844-852. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.099>
- Quintana, W., Pinzón, E., y Torres, D. (2017). Efecto de un fosfato térmico sobre el crecimiento y producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Cv ica cerinza. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 20(1), 51-59. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v20n1/v20n1a07.pdf>
- Restrepo, J. (2007). *Biofertilizantes preparados y fermentados a base de mierda*. Heifer Internacional [Archivo PDF]. <http://agroecologia.org/wp-content/uploads/2016/12/ABC-de-la-Agricultura-organica-Abonos-organicos.pdf>
- Restrepo, S., Pineda, E., y Ríos, L. (2017). Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Gestión y sostenibilidad ambiental*, 18(2), 335-351. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:635
- Rojas, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general* [Archivo PDF]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8391>
- Romero, F. (01 de Julio de 2018). *Selección e inoculación de hongos nativos solubilizadores de fósforo del Estado de Coahuila, en jitomate bajo diferentes dosis de fertilización orgánica* [Tesis de grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/45467>
- Romero, F., Arias, R., y Mendoza, R. (2019). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. 126. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1390>
- Saburido, M., y Herrera, A. (2015). El frijol en la era genómica. *UNAM*, 16(2). <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art11/art11.pdf>
- Saghir, M., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., y Ahmad, P. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/03650340902806469>

- Sotelo, C., Gonzáles, R., Mansilla, N., Soto, M., Balbi, C., y Pérez, G. (2020). Biofertilizantes: Experiencias realizadas en la provincia del Chaco en cultivos intensivos y extensivos. *Agrotecnia*, 30, 57-65. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.30972/agr.0304657>
- Souchie, E., Azcón, R., Barea, J., Silva, E., y Saggin, O. (2010). Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 771-777. <https://www.scielo.br/j/aabc/a/88xv7fcjktmPnkshbm6xGJF/?lang=en&format=pdf>
- Suárez, M., Martín, M., Pichardo, T., Rodríguez, E., Barbón, R., Capote, A., Pérez, A., y Capó, Y. (Marzo de 2019). Solubilización de fosfatos in vitro por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* y promoción del crecimiento de plantas de cafeto. *Bioteología Vegetal*, 19(1), 65-72. <http://scielo.sld.cu/pdf/bvg/v19n1/2074-8647-bvg-19-01-65.pdf>
- Tofiño, A., Velásquez, A., y Zapata, M. (2016). *Indicadores edafológicos del cultivo de frijol en el Caribe seco colombiano: una estrategia in situ*. Corpoica. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/1983/80439_67005.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Torres, E., Quishpe, D., Sánchez, A., Reyes, M., González, B., Torres, A., Cedeño, A., y Haro, A. (21 de Enero de 2013). Caracterización de la producción de frijol en la provincia de Cotopaxi Ecuador: Caso comuna Panyatug. *Ciencia y Tecnología*, 6(1), 23-31. https://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V6%20N1%204Caract%20produccion%20frijol,%20Comuna%20Panyatug.pdf
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs. (2019). *World Population Prospects. Highlights*. https://population.un.org/wpp/publications/files/wpp2019_highlights.pdf
- Valladares, A. (Julio de 2010). *Taxonomía y botánica de los cultivos de grano* [Archivo PDF]. <https://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/unidad-ii-taxonomia-botanica-y-fisiologia-de-los-cultivos-de-grano-agosto-2010.pdf>
- Vargas, P., y Castro, L. (2019). Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de andisoles de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 47-68.
- Vera, M., Chávez, R., Molina, V., León, J., Olvera, O., Alvarado, H., y Lahuasi, L. (2017). Determinación De La Influencia De Las Fases Lunares, Utilizando Tres Variedades

De Fréjol (*Phaseolus Vulgaris* L.) En El Cantón Antonio Ante, Provincia De Imbabura. *European Scientific Journal*, 13(6), 190-205. <https://doi.org/https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n6p190>

Villalba, A., Cruz, M., y Azuara, G. (2018). *Aspergillus niger* Tiegh., aislado en Sonora, México: evaluación de tolerancia a metales. *Scielo*, 24(14), 132-146. <https://doi.org/https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.023>

Viteri, K, Cadena, J., Moreira, N., y Molina, D. (2022). Primer estudio de dos especies de *Aspergillus* aisladas de bosques de manglar en Ecuador. *Revista de Ciencias de la vida*, 35(1), 20-32. <https://doi.org/http://doi.org/10.17163/lgr.n35.2022.02>

Xiao, C., Chi, R., Li, X., y Xia, Z. (2011). Biosolubilización de fosfato de roca por tres cepas fúngicas tolerantes al estrés. *Appl Biochem Biotecnología*, 165(2), 719-27. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9290-3>

Yadav, A., Mishra, S., Kour, D., Yadav, N., y Kumar, A. (2020). Hongos Solubilizadores de Fosfato: Perspectiva Actual, Mecanismos y Aplicaciones Agrícolas Potenciales. *Fungal Biology*, 121-141. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-45971-0_6

ANEXOS

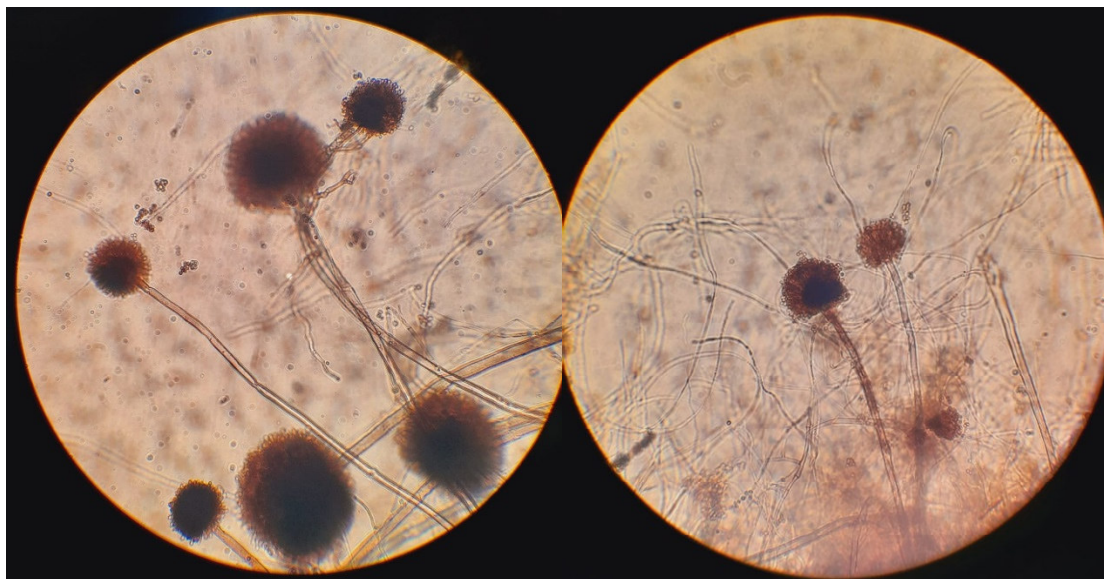
Anexo 1. Espacio para el ensayo en la granja experimental ECAA.



Anexo 2. Reactivación y crecimiento del hongo en medio de cultivo PDA.



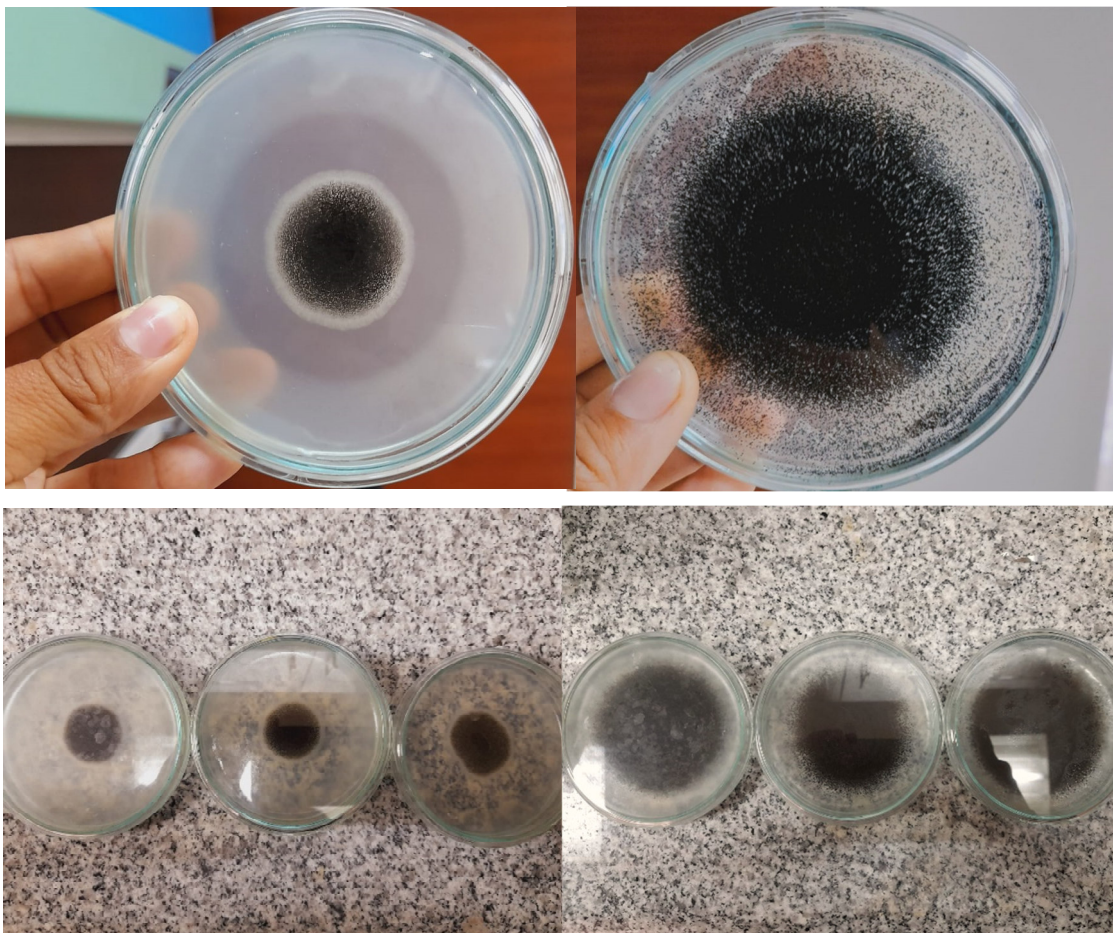
Anexo 3. Observación del hongo bajo microscopio compuesto con lente 40x.



Anexo 4. Medio de cultivo Agar Pikovskaya Modificado.

Cantidad	Reactivo
0,5 g/l	Extracto de malta
10,0 g	Dextrosa
5,0 g	Ca ₃ (PO ₄) ₂
0,5 g	(NH ₄) ₂ SO
0,2 g	K Cl
0,1 g	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,0001 g	MnSO ₄ .H ₂ O
0,0001 g	FeSO ₄ .7H ₂ O
15 g	Agar

Anexo 5. Prueba de solubilización de fósforo In vitro.



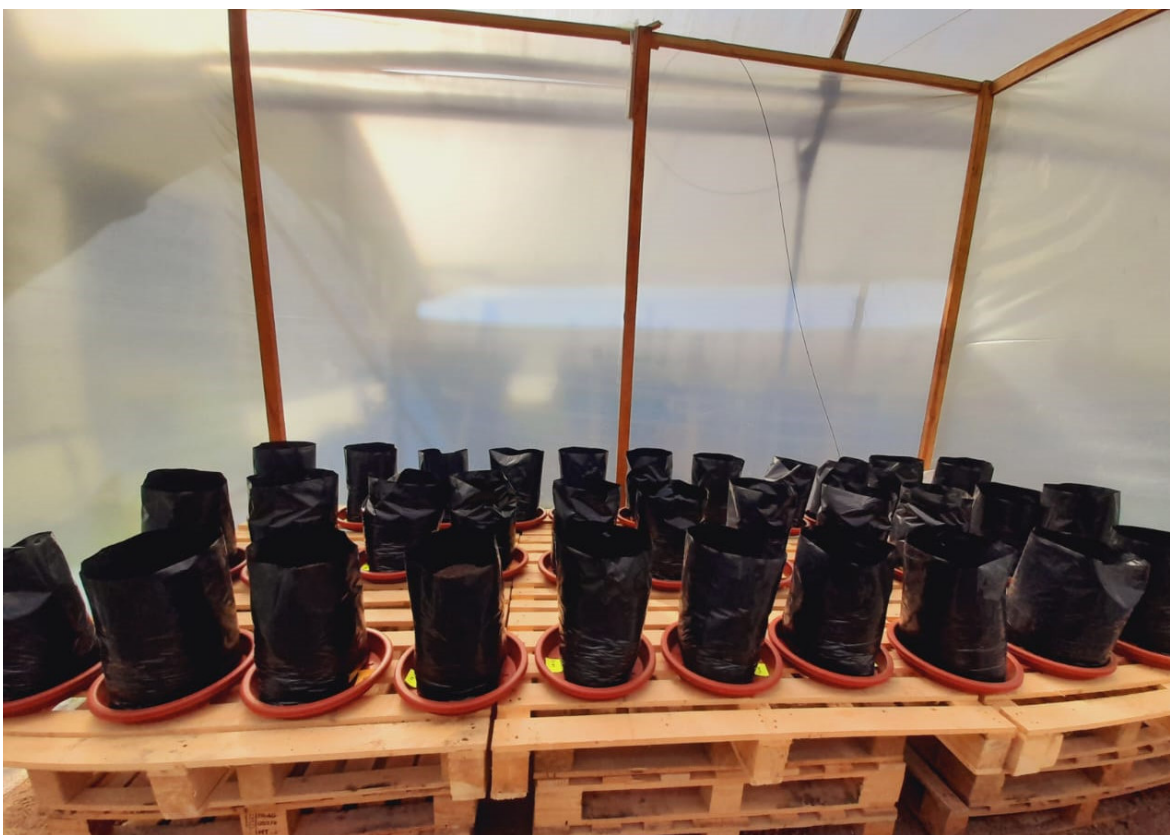
Anexo 6. Preparación del inóculo y de la suspensión de goma arábica más azúcar



Anexo 7. Recolección del suelo en una parcela del cantón San Pedro de Huaca.



Anexo 8. Secado, tamizado del suelo recolectado y llenado de bolsas.



Anexo 9. Selección y desinfección de semilla certificada I-481 Rojo del Valle.



Anexo 10. Inoculación del *Aspergillus niger* P., a la siembra, 15 días y 45 días.





Anexo 11. Labores culturales realizadas durante el ciclo del cultivo de fréjol.





Anexo 12. Proceso de destilación y esterilización a 121 °C del agua para riego.



Anexo 13. Muestreo de suelo en la parcela de pasto y análisis químico inicial.



MC-LASPA-2201-01



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS
 Panamericana Sur Km. 1 S/N Cutuglagua.
 Tifs. (02) 3007284 / (02)2504240
 Mail laboratorio.dsa@iniap.gob.ec



INFORME DE ENSAYO No: 22-0238

NOMBRE DEL CLIENTE: Anrango Navas Joselyn Marlene
PETICIONARIO: Anrango Navas Joselyn Marlene
EMPRESA/INSTITUCIÓN: Anrango Navas Joselyn Marlene
DIRECCIÓN: Otavalo

FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA:
HORA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA:
FECHA DE ANÁLISIS:
FECHA DE EMISIÓN:
ANÁLISIS SOLICITADO:

25/03/2022
 9:45
 04/04/2022
 08/04/2022
 S1 + TEXTURA

Análisis	Ph	N	P	S*	B*	K	Ca	Mg	Zn*	Cu*	Fe*	Mn*	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	Bases		Textura (%)				IDENTIFICACIÓN	
																meq/100g	meq/100g	%	%	Arena	Limo		Arcilla
22-0797	5,82 Me Ac	142 A	159 A			0,66 A	7,63 A	1,47 A					5,19	2,22	13,76	9,76			38	49	13	Franco	Testis Suelo Huaca

Análisis	Al+H*	Al*	Na *	C.E.*	N. Total*	N-NO3 *	K H2O*	P H2O*	Cl*	pH KCl*	IDENTIFICACION

OBSERVACIONES:

* Ensayos no solicitados por el cliente

METODOLOGIA USADA	
pH =	Suelo: Agua (1:2,5) P K Ca Mg = Olsen Modificado
S.B =	Fosfato de Calcio Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado
AlH =	Titulación NACH B = Curcumina

INTERPRETACION		
pH	Elemento	
Ac = Acido	II = Neutro	B = Bajo
LAc = Liger. Acido	LAI = Lige. Alcalino	M = Medio
PH = Phac. Neutro	N = Alcalino	A = Alto
RC = Requieren Cal	T = Tóxico (Boro)	

ABREVIATURAS	
C.E =	Conductividad Eléctrica
M.O =	Materia Orgánica

METODOLOGIA USADA	
C.E. =	Paste Saturada
M.O. =	Dicromato de Potasio
AlH =	Titulación NACH

INTERPRETACION			
Al+Al y Na	C.E.	M.O y Cl	
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio
T = Tóxico			A = Alto


 Firmado e institucionalmente por:
JOSE ALONSO LUCERO MALATAY
 LABORATORISTA


 Firmado e institucionalmente por:
IVAN RODRIGO SAMANIEGO MAIGUA

RESPONSABLE DE LABORATORIO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

* Opiniones de interpretación, etc. que se indican en este informe constituye una guía para el cliente.

Anexo 15. Evaluación del cultivo de fréjol.



Anexo 16. Cultivo de fréjol 15 días después de la siembra.



Anexo 17. Estado del cultivo previo a la floración.



Anexo 18. Cultivo de fréjol en floración.



Anexo 19. Formación y llenado de vaina.



Anexo 20. Cultivo de fréjol a los 100 días del cultivo.





Anexo 21. Proceso de monitoreo de la presencia del hongo inoculado



Anexo 22. Base de datos de la investigación

a) Recolección de datos del rendimiento (kg/ha) de los tratamientos.

Tratamiento	R1	R2	R3
T1	873,3	793,9	833,3
T2	791,7	792,2	794,4
T3	769,4	743,9	758,3
T4	808,3	822,2	795,0
T5	791,7	811,1	825,0
T6	910,6	919,4	925,6
T7	998,9	970,6	1008,3
T8	977,2	925,0	952,8
T9	900,0	847,2	948,9
T10 (Testigo 1)	674,5	637,8	711,1
T11 (testigo 2)	1002,8	1006,1	1000,0

b) Recolección de datos del número de vainas

Tratamiento	R1	R2	R3
T1	7	7	7
T2	7	7	8
T3	7	9	8
T4	8	8	8
T5	8	7	7
T6	9	8	7
T7	9	10	9
T8	9	9	8
T9	7	7	9
T10 (Testigo 1)	6	6	7
T11 (testigo 2)	10	9	10

c) Recolección de datos del número de granos por vaina

Tratamiento	R1	R2	R3
T1	4	4	4
T2	4	4	4
T3	4	3	4
T4	3	4	4
T5	3	4	4
T6	3	4	4
T7	4	4	4
T8	3	4	4
T9	4	4	4
T10 (Testigo 1)	3	3	4
T11 (testigo 2)	4	4	4

d) Recolección de datos de la longitud de la raíz (cm)

Tratamiento	R1	R2	R3
T1	50,50	55,00	46,00
T2	43,00	53,00	48,00
T3	57,00	54,00	54,00
T4	52,00	47,00	45,00
T5	65,00	54,00	61,00
T6	57,50	50,00	65,00
T7	71,00	64,00	67,50
T8	49,00	54,00	45,00
T9	51,00	54,00	60,00
T10 (Testigo 1)	68,00	67,00	72,00
T11 (testigo 2)	58,00	60,00	66,00