



**Ciencia Latina**  
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.  
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), noviembre-diciembre 2024,  
Volumen 8, Número 6.

[https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v8i6](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i6)

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR DE HONGOS RIZOSFÉRICOS  
SOLUBIZADORES DE FÓSFORO ASOCIADOS A  
LOS CULTIVOS DE TOMATE (SOLANUM  
LYCOPERSICUM) Y ARROZ (ORIZA SATIVA)**

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
PHOSPHORUS SOLUBILIZING RHIZOSPHERIC FUNGI  
ASSOCIATED WITH TOMATO (SOLANUM LYCOPERSICUM)  
AND RICE (ORIZA SATIVA) CROPS

**Adriana Catalina Demera**

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales

**Telmo Ariel Escobar Troya**

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales

**José Alcides Flores Cedeño**

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales

**Ítalo Antonio Pincay**

Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí

**Katuska Madelein López**

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales

**Omar Jacobo Montaña**

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales

## Aislamiento y caracterización molecular de hongos rizosféricos solubilizadores de fósforo asociados a los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y arroz (*Oriza sativa*)

**Adriana Catalina Demera<sup>1</sup>**

[adriana.demerama@ug.edu.ec](mailto:adriana.demerama@ug.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0003-2102-2949>

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales  
Guayaquil, Ecuador

**Telmo Ariel Escobar Troya**

[telmo.escobart@ug.edu.ec](mailto:telmo.escobart@ug.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0003-2227-9068>

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales  
Guayaquil, Ecuador

**José Alcides Flores Cedeño**

[jose.floresce@ug.edu.ec](mailto:jose.floresce@ug.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0003-2909-7849>

**Ítalo Antonio Pincay**

[italovich@gmail.com](mailto:italovich@gmail.com)

<https://orcid.org/0009-0008-6151-6613>

Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí  
Manta, Ecuador

**Katiuska Madelein López**

[katiuska.lopezlf@ug.edu.ec](mailto:katiuska.lopezlf@ug.edu.ec)

<https://orcid.org/0000-0002-9143-7333>

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales  
Guayaquil, Ecuador

**Omar Jacobo Montaña**

[Omar.montanos@ug.edu.ec](mailto:Omar.montanos@ug.edu.ec)

<https://orcid.org/0009-0003-0778-3538>

Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales  
Guayaquil, Ecuador

### RESUMEN

Los minerales, especialmente el fósforo es crucial para los suelos agrícolas; donde los hongos solubilizadores de fosfato (HSF) tienen un rol muy importante en la biodisponibilidad de los nutrientes para las plantas. Este trabajo se centró en el aislamiento y caracterización molecular de hongos rizosféricos solubilizadores de fósforo; asociados a cultivos de tomate y arroz. Las cepas aisladas (HSPA 1, HSPT 1 y HSPT4), se inocularon en medio de cultivo NBRIP sólido, con concentraciones de fosfato tricálcico al 1%, 0,50% y 0,10%. La capacidad de solubilización, se determinó por la aproximación del diámetro de formación del halo hialino, frente al perímetro de marcado de las colonias fúngicas. El aislado HSPT4 (cultivo de tomate), demostró el índice mayor en la capacidad de solubilización (2,28 mm) con una concentración de fósforo soluble de  $15,50 \pm 0,67$  mg/L. Se observó una correlación positiva moderada entre la concentración de fósforo y el pH final para concentraciones del 1 y 0,50%, mientras tanto; que para el 0,10% se registró una correlación más débil. La caracterización molecular, a partir de los códigos de barras dirigidos a las regiones ITS 1 e ITS 4; demostró que las cepas aisladas fueron identificadas como HSPA1 (*Talaromyces veerkampii*); HSPT1 a *Talaromyces versatilis* y HSPT4 a *Talaromyces purpureogenus*. Aquí, incorporamos la identificación molecular de dos cepas de hongos competentes (HSPA 1 y HSPT 1); para solubilizar fósforo, este componente investigativo representa su primer reporte a nivel molecular en esta región.

**Palabras clave:** talaromyces, fosfato tricálcico, ITS; NBRIP; hongos rizosféricos

<sup>1</sup> Autor principal

Correspondencia: [adriana.demerama@ug.edu.ec](mailto:adriana.demerama@ug.edu.ec)

# Isolation and molecular characterization of phosphorus solubilizing rhizospheric fungi associated with tomato (*Solanum lycopersicum*) and rice (*Oriza sativa*) crops

## ABSTRACT

Minerals, especially phosphorus is crucial for agricultural soils; where phosphate solubilizing fungi (PSF) play a very important role in the bioavailability of nutrients to plants. This work focused on the isolation and molecular characterization of phosphorus solubilizing rhizospheric fungi associated with tomato and rice crops. The isolated strains (HSPA 1, HSPT 1 and HSPT4) were inoculated into culture medium NBRIP with tricalcium phosphate concentrations of 1%, 0.50% and 0.10%. The solubilization capacity was determined by the approximation of the hyaline halo formation diameter versus the marking perimeter of the fungal colonies. Strain HSPT4 (tomato cultivation), demonstrated the highest index in solubilization capacity (2.28 mm) with a soluble phosphorus concentration of  $15.50 \pm 0.67$  mg/L. A moderate positive correlation between phosphorus concentration and final pH was observed for concentrations of 1 and 0.50%, while a weaker correlation was recorded for 0.10%. Molecular characterization, from barcodes targeting the ITS 1 and ITS 4 regions; showed that the isolated strains were identified as HSPA1 (*Talaromyces veerkampii*); HSPT1 to *Talaromyces versatilis* and HSPT4 to *Talaromyces purpureogenus*. Here, we incorporate the molecular identification of two competent fungal strains (HSPA 1 and HSPT 1); to solubilize phosphorus, this research component represents its first report at the molecular level in this region.

**Keywords:** talaromyces, tricalcium phosphate, ITS; NBRIP, rhizospheric fungi

*Artículo recibido 12 octubre 2024*

*Aceptado para publicación: 16 noviembre 2024*



## INTRODUCCIÓN

Los minerales, especialmente el fósforo (P), son cruciales para la formación y funcionalidad de los suelos agrícolas y nativos, desempeñando un papel vital en el desarrollo de las plantas. Su presencia en la naturaleza oscila entre 400-1200 mg/kg, solo el 0.1% está disponible para las plantas (Mei et al., 2021). La actividad de microorganismos, como los hongos solubilizadores de fosfato (HSF), es esencial para la mineralización del fósforo orgánico (Po) y la solubilización del fósforo inorgánico (Pi), facilitando su absorción por las plantas para la síntesis de ADN, ARN y ATP.

En la rizosfera de los suelos agrícolas, los exudados de las raíces de las plantas contienen moléculas como carbohidratos, aminoácidos, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. La relación simbiótica entre microorganismos y plantas, especialmente con HSF, es significativa, llegando al 70% (Samreen y Kausar, 2019). Los HSF producen ácidos orgánicos y enzimas que transforman compuestos de fosfato insolubles en formas solubles, beneficiando también a las plantas mediante la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y mejora en la absorción de nutrientes (Silva et al., 2023).

El arroz (*Oryza sativa*) es fundamental para la economía ecuatoriana, cultivado principalmente en las provincias de Los Ríos y Guayas. Sin embargo, la sequía ha afectado los suelos, resultando en un pH promedio de 5,60-6,50 y provocando deficiencias nutricionales. El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) también es importante, pero su productividad y calidad no han mejorado proporcionalmente debido a prácticas agrícolas inadecuadas, como la excesiva aplicación de fertilizantes fosforados y la quema post-cosecha, que alteran la composición química del suelo y afectan la viabilidad de la microbiota.

Trabajos *in vitro* han demostrado que los HSF del filo Ascomycota, como *Aspergillus* y *Penicillium*, incrementan la concentración de fósforo soluble en el sustrato, promoviendo el desarrollo de las plantas. Sin embargo, la identificación fenotípica de estos hongos no es recomendada debido a su subjetividad y variabilidad morfológica bajo diferentes condiciones ambientales.

La aplicación de técnicas de Biología Molecular; como la amplificación de ADNg mediante la técnica de PCR; utilizando primers específicos dirigidos a las regiones ITS1 e ITS4, permiten una demarcación taxonómica altamente específica para la caracterización de especies. Este trabajo, apunta al aislamiento; purificación, determinación cualitativa - cuantitativa y, caracterización molecular de HSF rizosféricos aislados a partir de cultivos de tomate y arroz.



## METODOLOGÍA

Estudio de tipo observacional, descriptivo Se recolectaron muestras de suelo; a partir de dos parcelas (25 m<sup>2</sup>) de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) y tomate (*Solanum lycopersicum*); ubicadas en las vías de Juján-Babahoyo-Los Ríos (1°50'57.2"S 79°32'58.9"W) y Libertad-Santa Elena (2°15'55.7"S 80°54'08.5"W). Utilizando el modelo predictivo de muestreo aleatorio reportado por Pérez-Pérez et al. (2021), se tomaron muestras en cinco puntos (esquinas y centro), extrayendo 20 g de sustrato de la rizosfera (15 cm de profundidad). Las muestras fueron colocadas en bolsas de polipropileno estériles, rotuladas y almacenadas a 4°C para su transporte y análisis.

Para el cultivo, aislamiento y purificación de las cepas de hongos, se realizó un pool de las muestras de suelo de cada área y se las etiquetó como muestras madre, de esto se tomó 1 g y se resuspendió en 9 mL de solución salina estéril (0,85%). Luego se incubó a 80°C/15 min (Shambhavi et al., 2020). Subsiguientemente, se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. Posteriormente, se colocó 0,1 mL de cada dilución en placas de Petri con medio NBRIP sólido con fosfato tricálcico al 0,50% (Nautiyal, 1999) y fueron incubadas a 30°C por siete días. Las colonias con halos de solubilización ≥ 0,50 mm fueron aisladas, luego se realizó tres ciclos de resembrado en NBRIP, para luego crear un primocultivo en medio PDA e incubado a 4°C.

Para el establecimiento y determinación cuantitativa de la solubilización de fósforo, los aislados de las líneas celulares puras, se resembraron las cepas seleccionadas por quintuplicado en medio NBRIP sólido con fosfato tricálcico al 0,10%, 0,50% y 1% (Seshadri et al., 2000). Para los registros comparativos se utilizó a *Aspergillus niger* (control positivo) y *Talaromyces amestolkiae* como control negativo. Post 14 días de incubación a 27°C, se calculó el Índice de Solubilización (IS) a través de la fórmula descrita por Kumar & Narula (1999):

Ecuación 1: «IS1»

$$IS: \frac{DHC}{DC}$$

Donde:

-IS: Índice de solubilización.

-DHC: Diámetro total, sumatoria entre el diámetro de la colonia y el halo.

-DC: Diámetro de la colonia



Para la cuantificación de la actividad solubilizadora en Medio Líquido, se realizaron pruebas cuantitativas en medio NBRIP líquido siguiendo la metodología reportada por Reddy et al. (2002) y Oliveira et al. (2009). Inicialmente se incubaron matraces con 50 mL de medio líquido y tres "plugs" de micelio por cepa a 28°C por 14 días, esta acción se la realizo de manera individual para cada concentración y matraz correspondiente, precedente a esto; el micelio tuvo un cultivo de siete días en medio PDA.

Al finalizar este tiempo, se centrifugó cada cultivo a 5000 rpm durante cinco min para medir el pH final «pH digital ATC®» (Chakraborty et al., 2010). Para la determinación de fósforo soluble, se utilizó el protocolo propuesto por Habibah et al., (2018), para ello se utilizó el espectrofotómetro de microplacas UV-VIS Multiskan™ Go de Thermo Scientific™. La lectura se realizó a una absorbancia de 890 nm y se utilizó una curva de calibración de concentración de fosfato soluble (mg/L) con una solución patrón de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. La Caracterización Molecular inicia con la extracción del ADNg fúngico; para ello se aplicó el protocolo de Morin et al (2010) modificado. Se realizo un raspado de colonias a partir de la muestra proveniente de un cultivo previo de siete días en PDA, se inoculo a 20 mL de PDB y se incubó por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó 5 mL del cultivo celular y se lo microcentrifugo a 1200rpm por 20 min, al pellet se le agregó 500 µL de tampón TES (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, SDS al 2% a un pH de 8,0) y, se sonicó a 20 KHz a 4°C por 1 min. Se traspasó la muestra sonicada a un microtubo (Eppendorf™) de 1,5mL, se adicionó 12,56 µL de Proteinasa K (20 mg/mL) e incubó a 37°C durante 30 min. Luego se agregó 140 µL de NaCl 5 M y 65,25 µL de CTAB (Tris 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 10%, pH 8,0) y se volvió a incubar a 65 °C por 10 min. Se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se colocó el tubo en hielo durante 5 min, y se volvió a centrifugar a 14000rpm por 10 min a 4°C, se extrajo el sobrenadante y transfirió a un nuevo microtubo de 2 mL.

Al sobrenadante, se le agregó 225 µL de acetato de amonio 5M/5 min en hielo y se centrifugó a 14000 rpm/5 min a 4°C. posteriormente, al sobrenadante se adicionó 0,50 volúmenes de isopropanol y luego el tubo se lo dejó reaccionar la mezcla a -20 °C durante 24 h. Finalmente, se centrifugo a 14000rpm/20 min a 4°C, el pellet que se obtuvo se lo lavó con 1mL de etanol frío al 70%, y se volvió a centrifugar a 14000 rpm/5 min a 4°C, el pellet se dejó secar en la cámara de flujo por un intervalo de 10 a 15 min, después se resuspendió el ADN extraído en 100 µL de agua ultrapura. Al final, el ADNg fue cuantificado en el NanoDrop (Thermo Scientific™).



Siguiendo el protocolo reportado por Ancona-Canché (2017) modificado, se llevó a cabo la amplificación del ADNg con los primers ITS (Espacio Transcriptor Interno) (Figura 3), para esto se preparó un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de solución de PCR realizado por triplicado con los siguientes componentes: 1  $\mu\text{L}$  de una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de cada pareja de cebadores ITS 4 (TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS 1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) (White et al., 1990), 10  $\mu\text{L}$  del GoTaq Green Master Mix (1x) (Thermo Scientific™), 4  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Invitrogen™ UltraPure™, 4  $\mu\text{L}$  de ADNg (10 ng/ $\mu\text{L}$ ). Al final, se colocó los microtubos en un termociclador, con los siguientes parámetros 95°C/ 2 min/ ciclo inicial, rampas de 95°C/1min, 53°C/ 45 seg/ 72°C/ 1min, ciclo pre-final 72°C y conservación a 4°C. Finalmente, las muestras se llevaron al equipo de electroforesis en gel, para comprobar la calidad de la amplificación.

Una vez obtenido los amplicones del fragmento ITS, para el análisis filogenético, estos; fueron enviados a secuenciar en Macrogen Inc., USA. Con las secuencias reportadas de los aislados fúngicos solubilizadores de fósforo, se limpió las secuencias en Mega 11, luego se cotejó la filogenia de los grupos más cercanos, esto es; entre los aislados, posteriormente se los identificó mediante el uso del Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la plataforma de NCBI, apoyado en la base de datos GenBank. Finalmente se construyó la filogenética por el análisis algorítmico de Máxima Verosimilitud (Kenneth et al., 2018) con un soporte Bootstrap de 1000 repeticiones (Mega 11) de los clados generados (Kumar et al., 2018).

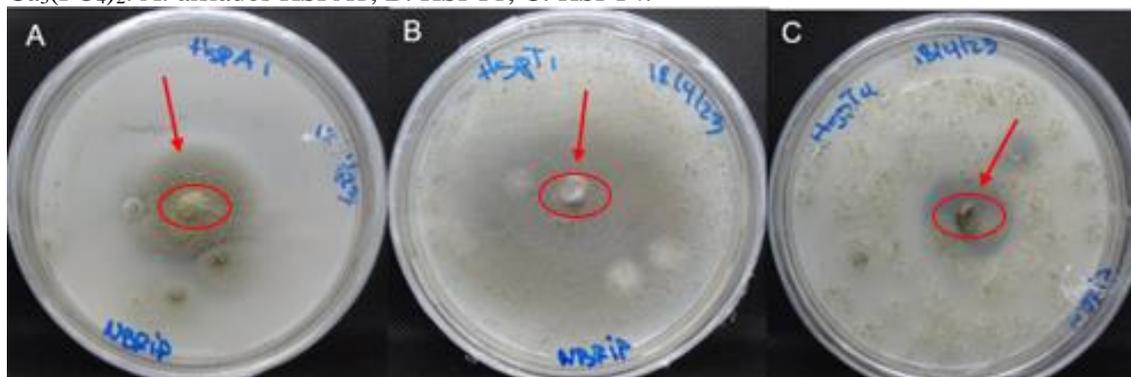
Utilizando el programa Past versión 4.03, se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) para evaluar diferencias estadísticas en los índices de solubilización y concentración de fósforo. Se sondeó la correlación entre el pH del medio y la concentración de ortofosfatos para ello se utilizó el test de Pearson (Pulido y Niño, 2015).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se extrajeron eficientemente hongos solubilizadores de fósforo (HSFs) inorgánico a partir de la rizosfera de plántulas de arroz y tomate. Durante el proceso, se identificaron ocho cepas fúngicas, que fueron codificadas como HSPA1, HSPA2, HSPA3, HSPA4 (para arroz) y HSPT1, HSPT2, HSPT3, HSPT4 (para tomate). Las cepas HSPA1, HSPT1 y HSPT4, constituyeron el 37,50 % del total de aislados con capacidad de solubilización positiva Pulido y Niño (2015) (Figura 1).



**Figura 1.** Aislamiento de hongos con capacidad solubilizadora en medio *NBRIP* sólido con 0.5% de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . A: aislados HSPA1; B: HSPT1; C: HSPT4.



Fuente: propia

Las cepas HSPA1 y HSPT1 mostraron un radio de halo de 0,50 mm, mientras que la cepa HSPT4 registró un radio de 1 mm. Los resultados indicaron una baja proporción de cepas con capacidad solubilizadora de fósforo, en comparación con los reportados por Arias et al. (2022) y Romero, Arias y Mendoza-Villareal (2019), quienes demostraron un mayor porcentaje de aislados con actividad de solubilización.

La discrepancia observada se atribuye a la cantidad reducida de cepas aisladas en este trabajo, en comparación con los trabajos mencionados, que utilizaron un mayor número de muestras. Esta limitación en el número de aislados podría explicar la menor presencia de HSFs. Adicionalmente, se considera que las malas prácticas agrícolas, tales como la quema de residuos post-cosecha y el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, han alterado el pH del suelo, lo cual ha impactado negativamente la microbiota del sustrato (Carvajal y Mera, 2010).

La cepa HSPT4 presentó la mayor capacidad de solubilización, con índices de solubilización (IS) de 2,11 mm, 2,27 mm y 2,47 mm para las concentraciones de 1 %, 0,50 % y 0,10 %, respectivamente. En segundo lugar, la cepa HSPT1 superó levemente al control positivo, registrando un IS de 2,10 mm, 2,08 mm y 2,43 mm para las mismas concentraciones. Por otro lado, la cepa HSPA1 solo superó al control positivo en la concentración de 0,50 %, con un IS de 2,06 mm.

**Tabla 1.** Resultados del índice de solubilización de las 3 cepas seleccionadas (HSPA, HSPT1, HSPT4) frente a las tres concentraciones de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (1%, 0,50%, 0,10%).

Cepas	Índice de solubilización (mm)		
	1%	0,50%	0,10%
Control +	2,06	2,02	2,40
Control -	1,00	1,00	1,00

HSPA 1	2,05	2,06	2,33
HSPT1	2,10	2,08	2,43
HSPT4*	2,11	2,27	2,47

\*Cepa que muestra mayor IS entre las tres concentraciones de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Fuente: propia

Tras obtener los valores del IS, se evaluó la normalidad y la igualdad de varianzas, arrojando que los datos no seguían una distribución normal, como lo indica un valor de  $p \leq 0,05$ . Por ello, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que resultó en un valor de  $p = 0,14$ , lo que sugiere la ausencia de diferencias significativas entre las medianas de los IS para las tres concentraciones evaluadas. A nivel cualitativo, los índices de solubilización de las cepas seleccionadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, los rangos obtenidos fueron menores a los reportados por autores como Romero, Arias y Mendoza-Villareal (2019), quienes encontraron un rango del IS más amplio.

Varios trabajos han sido reportados, donde han demostrado los diferentes valores del IS asociados al género fúngico (Hernández-Leal et al., 2011; Verma y Ekka, 2015; Elías et al., 2016; Hajjam y Cherkaoui, 2017). En comparación con otros trabajos, este trabajo revela un rango de solubilización relativamente bajo. Esta variabilidad puede atribuirse a varios factores, como la fuente de fósforo, la especie o tipo de ácidos orgánicos producidos por los hongos, así como la elección del medio de cultivo. Trabajos previos han demostrado que la composición del medio puede influir significativamente en los resultados de solubilización de fósforo (Narsian y Patel, 2000; Barroso y Nahas, 2002; Reddy et al., 2002; Mittal et al., 2008).

En cuanto a la determinación de fósforo soluble en cultivos líquidos, se demuestra que la cepa HSPT4 presentó la mayor concentración de solubilización siendo esta de  $14,43 \pm 0,71$  mg/L,  $14,69 \pm 0,81$  mg/L y  $17,39 \pm 0,51$  mg/L para las concentraciones de 1 %, 0,50 % y 0,10 %, respectivamente, siguiendo una tendencia similar a la observada en los índices de solubilización (IS). Sin embargo, no superó al control positivo, *Aspergillus niger*, el cual alcanzó concentraciones de P soluble significativamente mayores:  $50,38 \pm 0,80$  mg/L,  $72,64 \pm 0,58$  mg/L y  $90,40 \pm 0,47$  mg/L (Tabla 3). Adicionalmente, se observó que la concentración de 0,10 % resultó ser la que mostró un mayor rango de solubilización para cada cepa. En este caso, HSPA1 alcanzó  $11,08 \pm 0,93$  mg/L, HSPT1 logró  $11,53 \pm 0,68$  mg/L, y HSPT4 obtuvo  $17,39 \pm$



0,51 mg/L, lo que sugiere que, a menor concentración de fósforo en el medio, se produce una mayor liberación de fósforo soluble. Estos resultados fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, la cual indicó que los datos correspondientes a las concentraciones de 0,50 % y 0,10 % no siguen una distribución normal. Por ello, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual arrojó un valor de  $p = 0,72$ , indicando la ausencia de diferencias significativas entre las medianas de los grupos evaluados.

**Tabla 2.** Concentración de P resultante en el sobrenadante después de los 14 días de cultivo en NBRIP líquido en las concentraciones 1%, 0,5% y 0,1%.

Cepas	Concentración de P (mg/L)		
	1%	0,50%	0,10%
Control +	50,38 ± 0,80	72,64 ± 0,58	90,40 ± 0,47
Control -	0,029 ± 0,0005	0,014 ± 0,0025	0,024 ± 0,0008
HSPA 1	10,09 ± 0,93	10,36 ± 1,00	11,08 ± 0,93
HSPT1	6,04 ± 0,68	8,02 ± 0,58	11,53 ± 0,68
HSPT4 *	14,43 ± 0,71	14,69 ± 0,81	17,39 ± 0,51

\* Cepa que muestra mayor IS entre las tres concentraciones de  $Ca_3(PO_4)_2$ . ± Desviación estándar.

Fuente: propia

Es importante destacar que, si bien las cepas seleccionadas demostraron actividad solubilizadora, los valores de fósforo soluble obtenidos fueron menores en comparación con el control positivo *A. niger*, y tampoco se observaron diferencias significativas entre las tres cepas evaluadas. Al comparar estos resultados con otros trabajos reportados, donde emplearon la misma concentración de fósforo (0,50 %), se observa que los valores obtenidos en este trabajo son inferiores. Investigaciones previas, como las de Hernández-Leal et al. (2011), Morales et al. (2011), Saxena et al. (2013), Rathore et al. (2014), Moreno et al. (2015), Lima-Rivera et al. (2016), Selvi et al. (2017) y Pineda (2014), reportaron rangos de solubilización superiores al analizar la actividad de solubilización en diferentes periodos de tiempo, con valores significativamente mayores de fósforo soluble en cultivos a partir del día siete hasta el día 21.

El bajo rendimiento en la solubilización de fósforo observado en las cepas evaluadas puede explicarse por su limitada capacidad para producir ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales son necesarios para liberar fosfatos del sustrato sólido. Este fenómeno ya ha sido documentado en trabajos previos (Fernández

et al., 2005), donde se evidenció que la falta de producción de estos ácidos es un factor clave que limita la efectividad de los hongos solubilizadores de fósforo.

De acuerdo con los resultados de los datos de fósforo (P) en mg/L y el pH final tras 14 días de cultivo (Tabla 4). En el control negativo, el pH se mantuvo casi constante al 1 % y 0,50 %, en comparación con el pH de inicio ( $6,50 \pm 0,2$ ). Sin embargo, en la concentración al 0,10 %, el pH se volvió ácido ( $5,84 \pm 0,11$ ). Al realizar el análisis de correlación entre la concentración de fósforo y el pH final, se identificó una correlación negativa moderada ( $r = -0,48$ ) entre el pH y la concentración en mg/L del 1 %, lo que sugiere que a medida que disminuye el pH, aumenta la concentración de fósforo soluble. Por otro lado, se observó una correlación positiva moderada ( $r = 0,67$ ) entre la concentración en mg/L del 0,5% y el pH, lo que indica que el aumento en la concentración de P en el medio puede relacionarse con un aumento del pH.

**Tabla 3.** Concentración de P resultante y su pH final en el sobrenadante después de los 14 días de cultivo en *NBRIP* líquido en las concentraciones 1%, 0,50% y 0,10%.

Cepas	Concentración de P (mg/L)			pH final		
	1%	0,50%	0,10%	1%	0,50%	0,10%
Control +	$50,38 \pm 0,80$	$72,64 \pm 0,58$	$90,40 \pm 0,47$	$5,46 \pm 0,054$	$5,1 \pm 0,14$	$3,54 \pm 0,75$
Control -	$0,029 \pm 0,0005$	$0,014 \pm 0,0025$	$0,024 \pm 0,0008$	$6,26 \pm 0,23$	$6,22 \pm 0,13$	$5,84 \pm 0,11$
HSPA 1	$10,09 \pm 0,93$	$10,36 \pm 1,00$	$11,08 \pm 0,93$	$5,8 \pm 0,41$	$5,32 \pm 0,13$	$4,84 \pm 0,11$
HSPT1	$6,04 \pm 0,68$	$8,02 \pm 0,58$	$11,53 \pm 0,68$	$5,38 \pm 0,48$	$4,74 \pm 0,27$	$4,42 \pm 0,23$
HSPT4	$14,43 \pm 0,71$	$14,69 \pm 0,81$	$17,39 \pm 0,51$	$6,2 \pm 0,35$	$4,68 \pm 0,10$	$4,54 \pm 0,054$

Fuente: propia

En las concentraciones de 0,50 % y 0,10 %, los resultados fueron similares en términos de pH y concentración de fósforo, aunque se destacó que en la concentración de 0,10 % la correlación entre ambas variables fue muy débil, en contraste con la correlación positiva moderada observada en la concentración

de 0,50 %. Esto sugiere que la interacción entre el pH y la concentración de P es más pronunciada en niveles más altos de concentración.

En diferencia, las cepas evaluadas (Control +, HSPT1, HSPT4, HSPA1) mostraron valores de pH ácido que oscilaron entre 3,54 y 5,80 en las tres concentraciones, lo cual es consistente con el mecanismo de solubilización de fosfatos a través de la producción de ácidos orgánicos. Cabe destacar que HSPT4, en la concentración del 1 %, mantuvo un pH de  $6,20 \pm 0,35$ , lo que representa una variación mínima; respecto al pH inicial de  $6,50 \pm 0,2$ . Este fenómeno difiere con otros trabajos, como los de Whitelaw et al. (1997), Pradhan y Sukla (2006) y Varsha et al. (2010), quienes reportaron que la liberación de ácidos orgánicos por parte de microorganismos solubilizadores de fósforo provoca una disminución significativa del pH en el medio de cultivo, promoviendo la liberación de fosfatos insolubles.

Los reportes de Romero, Arias y Mendoza-Villareal (2019) respalda esta idea, al señalar que la cepa de *Penicillium* sp. mostró una solubilización elevada, acompañada de un pH final ácido; tras 15 días de cultivo. En contraste, los resultados de este trabajo revelan que la cepa HSPT4, la cual demostró la mayor solubilización de fósforo con un pH final menos ácido en comparación, lo que sugiere una menor producción de ácidos orgánicos, posiblemente debido a las diferencias en las condiciones del medio y en el tiempo de incubación (14 días en este caso).

En cuanto a la caracterización molecular, los tamaños de los productos de amplificación positiva por PCR; obtenidos para las tres cepas aisladas corresponden para la cepa HSPA1(466 pb), HSPT4 (476 pb) y HSPT1 (490 pb); logrando amplificar las regiones de los ITS 1, 5.8S e ITS2.

**Tabla 4.** Porcentaje de similitud nucleotídica con relación a la región completa del ITS 1- gen 5.8s ARNr e ITS 2 (Blast-GenBank).

Cepa	Blast			
	Organismo	Nº accesión	% Similitud	Fuente
HSPT 1	<i>Talaromyces versatilis</i>	MK837960.1	100	Wei, Xu y Wang, 2021
HSPA 1	<i>Talaromyces veerkampii</i>	MH793040.1	100	Peterson y Jurjevic, 2019

---

HSPT 4	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	ON063296.1	99,58	Pathmanathan et al., 2022
--------	----------------------------------	------------	-------	---------------------------

---

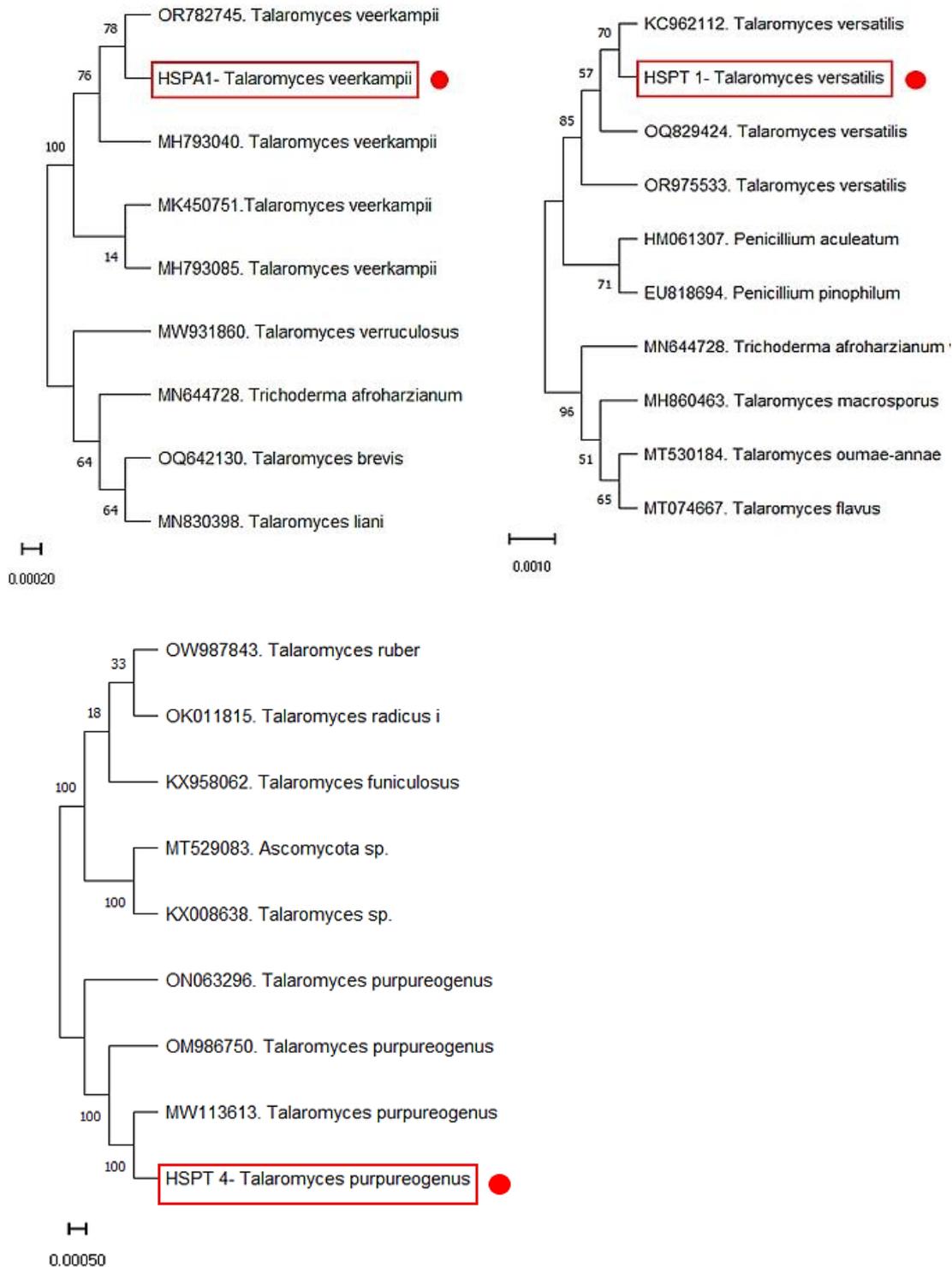
Fuente: propia

De acuerdo con el análisis de homología a partir de secuencias enfrentadas en el GenBank por Blast del NCBI (Tabla 4); reveló que las tres cepas halladas (HSPA1, HSPT1 y HSPT 4) pertenecen a la familia Trichocomaceae, dentro del género *Talaromyces*. Hay que destacar que cada cepa corresponde a una especie diferente. El análisis de similitud demostró que la cepa HSPT 1 obtuvo una homología match 100% con *T. versatilis*. De igual manera, HSPA 1 también tuvo un match 100% y fue identificada como *T. veerkampii*. Por último, HSPT 4 se clasificó como la especie *T. purpureogenus*, con una homología del 99,58%. Estos resultados subrayan la diversidad intraespecífica dentro del género *Talaromyces*, evidenciando las sutilezas génicas que distinguen a cada cepa.

El análisis filogenético de las secuencias ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de las tres cepas fúngicas, determino que el "Maximum Likelihood" - Kimura-2 parámetros + G (gamma), valido su identificación taxonómica con altos niveles de confiabilidad en el Bootstrap (Bt) testeado. Las cepas HSPA1, HSPT1 y HSPT4 fueron identificadas como *Talaromyces veerkampii*, *Talaromyces versatilis* y *Talaromyces purpureogenus*, respectivamente, con valores de Bt que van desde el 70 % al 100 %, lo que respalda la precisión de la identificación y su agrupación en clados bien definidos (Figura 2). Esta identificación, realizada con los primers ITS1 e ITS4, concuerda con trabajos previos de Adhikari et al. (2022) y Yilmaz et al. (2012), quienes confirmaron la fiabilidad del uso de códigos de barras moleculares en hongos del género *Talaromyces*.



**Figura 2.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de la cepa HSPA 1 (izquierda-superior), la HSPT 1 (derecha-superior) y la HSPT4 (abajo) basado en el alineamiento de la región ITS1- 5.8S rRNA-ITS 2, con los accesos reportados en el Gen Bank.



Fuente: propia

Particularmente, *T. purpureogenus* (anteriormente *Penicillium purpureogenum*) demostró una mayor capacidad solubilizadora de fosfatos en este trabajo, una característica atribuida a su capacidad de producir ácido glucónico mediante la oxidación directa de glucosa, como reportó Frisvad (1989). Esta habilidad no

ha sido reportada previamente en *T. veerkampii* y *T. versatilis*, lo que sugiere que estas especies podrían representar nuevos registros de hongos solubilizadores de fósforo (HSF).

El género *Talaromyces* tiene un alto potencial biotecnológico debido a su capacidad para producir compuestos bioactivos y enzimas de interés industrial. Especies como *T. purpureogenus* y *T. versatilis* han demostrado actividad antiviral y antibacteriana, incluyendo la inhibición de patógenos de abejas y otros mamíferos, según investigaciones recientes (Sandeepani y Ratnaweera, 2020; Vocadlova et al., 2023). Además, cabe destacar que ninguna de estas especies produce micotoxinas perjudiciales para la salud humana, lo que incrementa su valor biotecnológico.

Por otro lado, *T. purpureogenus* ha mostrado un alto potencial farmacéutico. Kumari et al. (2018) demostraron que extractos de acetato de etilo de esta especie inducen apoptosis en células cancerígenas HeLa, lo que podría tener aplicaciones en la síntesis de nuevos tratamientos oncológicos. Asimismo, *T. versatilis* ha sido evaluado por Llanos et al. (2019) por su capacidad para producir enzimas lignocelulolíticas, lo que lo convierte en un candidato ideal como aditivo alimentario para mejorar la digestión de dietas basadas en cereales, contribuyendo al aumento de peso en animales, tal como lo mencionan FEEDAP (2013) y Cozannet et al. (2017).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se aislaron cepas de hongos solubilizadores de fosfato de las rizosferas de arroz y tomate. Del cultivo de arroz se obtuvo la cepa HSPA 1, mientras que del tomate se encontraron dos cepas solubilizadoras, HSPT 1 y HSPT 4, representando el 37,50 % de los hongos identificados. La cepa HSPT 4 destacó con el mayor Índice de Solubilización (2,28 mm) y la mayor concentración de fósforo soluble ( $15,50 \pm 0,67$  mg/L). Se observó una correlación negativa moderada entre el pH final y la concentración de fósforo soluble en las tres concentraciones de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  evaluadas. Finalmente, la identificación molecular reveló que la cepa HSPA 1 corresponde a *Talaromyces veerkampii*, HSPT 1 a *Talaromyces versatilis* y HSPT 4 a *Talaromyces purpureogenus*. Esta identificación permitió reconocer a las dos primeras especies (HSPA1 y HSP1) como nuevos registros de hongos con capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico, ampliando el conocimiento sobre la diversidad de este tipo de microorganismo.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, M., Kim, H.S., Park, H.B., Kim, K.Y., Lee, I.K., Byeon, E.J., Woo, J.M., Lee, H.B., & Lee, Y.S. (2022). Characterization of Newly Recorded *Talaromyces veerkampii* Isolated from Field Soil in Korea based on Morphology and Multigene Sequence Analysis. *Kor. J. Mycol*, 50(4), 347-355.
- Ancona-Canché, K., López-Adrián, S., Espinosa-Aguilar, M., Garduño-Solórzano, G., Toledano-Thompson, T., Narváez, J., & Valdez-Ojeda, R. (2017). Molecular phylogeny and morphologic data of strains of the genus *Coelastrella* (Chlorophyta, Scenedesmaceae) from a tropical region in North America (Yucatán Península). *Botanical Sciences*, 95 (3), 527-537.
- Arias Mota, R. M., Juárez González, A., Heredia Abarca, G., & De la Cruz Elizondo, Y. (2022). Capacidad fosfato solubilizadora de hongos rizosféricos provenientes de cafetales de Jilotepec, Veracruz. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 7(27), 69-86.
- Arias, R.M., Romero, A.J., Bañuelos, J., y De la Cruz, Y. (2019). Inoculación de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas arbusculares en plantas de jitomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(10).
- Barroso, C. B., & Nahas, E. (2002). Solubilization of hardly soluble iron and aluminum phosphates by the fungus *Aspergillus niger* in the soil. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102, 193-198.
- Carvajal Muñoz, J. S., & Mera Benavides, A. C. (2010). Fertilización biológica: Técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Produc. Limp.* 5, 77-96.
- Chakraborty, B., Chakraborty, U., Sha, A., Sunar, K., & Dey, P. (2010). Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North Bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(2), 195-200.
- Cozannet, P., Kidd, M.T, Neto, R.M., y Geraert, P.A. (2017). Complejo multicarbohidrasa de próxima generación que degrada polisacáridos sin almidón, rico en xilanasa y arabinofuranosidasa para mejorar la digestibilidad del alimento para pollos de engorde. *Ciencia avícola*, 96 (8), 2743-2750.
- Elías, F., Woyessa, D., & Muleta, D. (2016). Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 1-11.



- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo*, 23(1), 31-37.
- Frisvad, J. (1989). La conexión entre la penicila y el aspergilli y las micotoxinas, con especial énfasis en los aislados mal identificados. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18, 452–467.
- Habibah, N., Sri Dhyaputri, I., Karta, I. W., Cok Dewi, W. H. S., & Choirul Hadi, M. (2018). A simple spectrophotometric method for the quantitative analysis of phosphate in the water samples. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 7(2), 198-204.
- Hajjam, Y., & Cherkaoui, S. (2017). The influence of phosphate solubilizing microorganisms on symbiotic nitrogen fixation: Perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Materials*, 8(3), 801-808.
- Kenneth, R., Ramírez-Coché, J.A., Castro, O., y Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP.Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kumar, V., & Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, 28(3), 301–305.
- Kumari, M., Taritla, S., Sharma, A., Jayabaskaran, C. (2018). Antiproliferative and Antioxidative Bioactive Compounds in Extracts of Marine-Derived Endophytic Fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Lima-Rivera, D. L., López-Lima, D., Desgarennes, D., Velázquez-Rodríguez, A. S., & Carrión, G. (2016). Phosphate solubilization by fungi with nematicidal potential. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(2), 507-524.
- Llanos, A., Déjean, S., Neugnot-Roux, V., Francois, J.M., y Parrou, J.L. (2019). Carbon sources and XlnR-dependent transcriptional landscape of CAZymes in the industrial fungus *Talaromyces versatilis*: when exception seems to be the rule. *Microb Cell Fact* 18, 14



- Mei, C., Chretien, R. L., Amaradasa, B. S., He, Y., Turner, A., & Lowman, S. (2021). Characterization of phosphate solubilizing bacterial endophytes and plant growth promotion in vitro and in greenhouse. *Microorganisms*, 9(9), 1935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>
- Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., & Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 718-727.
- Morales, A., Alvear, M., Valenzuela, E., Castillo, C. E., & Borie, F. (2011). Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilising fungi as potential biofertiliser. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11(4), 89-103.
- Moreno, A. P., Osorio, N. W., & González, O. A. (2015). In vitro dissolution of acidulated rock phosphate by phosphate solubilizing microorganisms. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 65-71.
- Morin, N., Vallaeys, T., Hendrickx, L., Natalie, L., & Wilmotte, A. (2010). An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*, 80, 148–154.
- Narsian, V., & Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 559-565.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270.
- Oliveira, C., Alves, V., Marriel, I., Gómez, E., Scotti, M., Carneiro, M., Guimarães, M., Schaffert, R., & Sa, N. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an-oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology & Biochemistry*, 41(9), 1782-1787.
- Pathmanathan, N., Deshappriya, N., Manamgoda, D. S., & Sandamali, T. G. (2022). Direct Submission. Botany, University of Sri Jayewardenepura.
- Pérez-Pérez, R., Forte, I. H., Álvarez, Y. O. S., Benítez, J. C. S., Castillo, D. S. Del, & Pérez-Martínez, S. (2021). Characterization of potassium solubilizing bacteria isolated from corn rhizoplane. *Agronomía Colombiana*, 39(3), 415–425.
- Peterson, S. W., & Jurjevic, Z. (2019). The *Talaromyces pinophilus* species complex. *Fungal Biology*, 123(10), 745-762.



- Pineda, B. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Ciencia en Desarrollo*, 5(2): 145-154.
- Pradhan, N., & Sukla, L. B. (2006). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 850-854.
- Rathore, P., Phanse, N., & Patel, B. (2014). Screening for microorganisms possessing phosphate solubilizing potential. *Indian Journal of Research*, 3(1), 172-174.
- Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K., & Reddy, M. S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 84(2), 187-189.
- Samreen, S., & Kausar, S. (2019). Phosphorus fertilizer: The original and commercial sources. In T. Zhang (Ed.), *Phosphorus recovery and recycling*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82240>
- Sandeepani, H. P., & Ratnaweera, P. B. (2020). Antibacterial activity of entomopathogenic fungi isolated from *Vespa affinis* and *Apis dorsata* in Sri Lanka. In: *International conference on Frontiers in Chemical Technology*
- Saxena, J., Basu, P., Jaligam, V., & Chandra, S. (2013). Phosphate solubilization by a few fungal strains belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(41), 4862-4869.
- Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V., & Saraswathi, K. (2017). Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology Journal*, 3(1), 1-7.
- Seshadri, S., Muthukumarasamy, R., Lakshminarasimhan, C., & Ignacimuthu, S. (2000). Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*, 79(5), 565-567.
- Shambhavi, Kumar, R., Tomar, A., Purushottam, Singh, J., & Singh, S. P. (2020). Isolation and identification of *Bacillus* species from soil for phosphate, potassium solubilisation and amylase production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(5), 415-426.
- Silva, L. I. d., Pereira, M. C., Carvalho, A. M. X. d., Buttrós, V. H., Pasqual, M., & Dória, J. (2023). Phosphorus-Solubilizing Microorganisms: A Key to Sustainable Agriculture. *Agriculture*, 13, 462.



- Varsha, M., Nidhi, & Anurag. (2010). Heavy metals in plants: phytoremediation: plants used to remediate heavy metal pollution. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(1), 40-46.
- Verma, A., & Ekka, A. (2015). Isolation, screening and assessment of phosphate solubilizing efficiency of some fungal isolates of Raipur, Chhattisgarh. *Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology*, 1(1), 29-39.
- Vocadlova, K., Lamp, B., Benes, K., Matha, V., Lee, K. Z., & Vilcinskas, A. (2023). Crude Extracts of *Talaromyces* Strains (Ascomycota) Affect Honey Bee (*Apis mellifera*) Resistance to Chronic Bee Paralysis Virus. *Viruses*, 15(2), 343.
- Wei, S., Xu, X., & Wang, L. (2021). Four new species of *Talaromyces* section *Talaromyces* discovered in China. *Mycologia*, 113(2), 492-508.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315–322.
- Whitelaw, S., McKeown, K., & Williams, J. (1997). Global health promotion models: Enlightenment or entrapment? *Health Education Research*, 12(4), 479-490.
- Yilmaz, N., Houbraken, J., Hoekstra, E.S., Frisvad, J., Visagie, C.M., Samson, R.A. (2012). Delimitación y caracterización de *Talaromyces purpurogenus* y especies relacionadas. *Persoonia*, 29:39-54.

