

EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON UN HONGO MICORRIZAL Y UN HONGO SOLUBILIZADOR DE
FÓSFORO EN LA ABSORCIÓN DE FOSFATO Y CRECIMIENTO DE *Leucaena leucocephala* EN UN
OXISOL

ALEJANDRO ANDRÉS LONDOÑO ÚSUGA

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR

NELSON WALTER OSORIO VEGA, I.A., M.Sc., Ph.D.

COMITÉ ASESOR

RAÚL DARIO ZAPATA HERNÁNDEZ, Químico., M.Sc., Ph.D.

MAURICIO ALEJANDRO MARÍN MONTOYA, I.A., M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS

2010

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a Luz Marina y Jesús María por su comprensión e incondicional apoyo; a ellos, ofrezco mis disculpas por las ausencias y decisiones tomadas.

Por que las cosas tienen que cambiar necesariamente

Alejandro Andrés Londoño Usuga

Febrero de 2010

RECONOCIMIENTOS

A la Dirección de Investigación de la Sede Medellín (DIME) por el apoyo financiero en el desarrollo de esta investigación a través del grupo de “MICROBIOLOGÍA DEL SUELO”.

A la Maestría en Ciencias Agrarias por el apoyo financiero en la compra de reactivos a través del programa “APOYO ECONÓMICO PARA TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN”.

A los Laboratorios de Suelos y Microbiología del Suelo por facilitar la logística requerida para ejecutar esta investigación.

AL INSTITUTO COLOMBIANO DE CREDITO EDUCATIVO Y ESTUDIOS TÉCNICOS EN EL EXTERIOR - ICETEX por el credito modalidad POSGRADO PAIS CON DEUDOR.

AGRADECIMIENTOS

A los señores profesores

Doctor Walter Osorio por su valiosa crítica, sugerencias y paciencia; a él, mi respeto y admiración.

Doctor Raúl Zapata por su voto de confianza y apoyo.

Doctor Mauricio Alejandro Marin Montoya por las enseñanzas recibidas.

Doctor José Miguel Cotes por sus consejos y cooperación.

Doctor Rolando Barahona por su apoyo y comprensión como Director del Área Curricular.

Doctor José Régulo Cartagena Valenzuela por sus acertadas recomendaciones.

A los compañeros y amigos

Maria Ivone Galeano Monsalve secretaria del Posgrado

Camilo Ramírez por sus consejos oportunos.

Astrid Elena Pérez López, Mariluz Ayala Vázquez, Catalina Zuluaga excelentísimas compañeras del posgrado.

Judy Madelein Giraldo Duque (por sus críticas e incondicionable amistad), Nodier Herrera, Nancy Fiorela, Milena Moreno, Mayra Alejandra Gandur Bacca, Andrea Bedoya, Laura posada, compañeros en el laboratorio. Ángela María López en la fotocopidora de la biblioteca y amigos de la cafetería, entre muchas otras personas más.

TABLA DE CONTENIDO

Ítem	Tema	Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Justificación	2
1.3	Hipótesis de trabajo	4
1.4	Objetivos	5
2	REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1	Suelos altamente meteorizados	6
2.2	Hongos micorrizales	7
2.3	Solubilización microbial de P	7
2.4	Mecanismos de solubilización microbial de P	8
2.5	Relaciones en la rizósfera	9
2.6	Función del P en los vegetales	9
3	MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1	Localización	11
3.2	Análisis de suelos	11
3.3	Experimento 1. Desorción microbial de P	11
3.4	Experimento 2. Efecto de niveles crecientes de RP sobre la capacidad de <i>Mortierella</i> sp. para disolver RP bajo condiciones <i>in vitro</i> .	12
3.5	Experimento 3. Efecto de niveles crecientes de glucosa sobre la capacidad de <i>Mortierella</i> sp. para disolver RP bajo condiciones <i>in vitro</i> .	13
3.6	Experimento 4. Efecto de la doble inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de P sobre la absorción de P y el crecimiento de leucaena en casa de malla.	13
4	RESULTADOS	16
4.1	Experimento 1. Sorción y desorción microbial de P	16

4.2	Experimento 2. Efecto de niveles crecientes de RP sobre la capacidad de <i>Mortierella</i> sp. para disolver RP bajo condiciones <i>in vitro</i> .	16
4.2.1	Concentración P en solución (mg L ⁻¹)	16
4.2.2	pH final del medio	16
4.2.3	Producción de biomasa fúngica (g)	16
4.3.	Experimento 3. Efecto de niveles crecientes de glucosa sobre la capacidad de <i>Mortierella</i> sp. para disolver RP bajo condiciones <i>in vitro</i>	16
4.3.1	Concentración P en solución (mg L ⁻¹)	16
4.3.2	pH final del medio	17
4.3.3	Producción de biomasa fúngica (g)	17
4.4	Experimento 4. Efecto de la doble inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de P sobre la absorción de P y el crecimiento de leucaena en casa de malla	17
4.4.1	Contenido de P foliar	17
4.4.2	P total absorbido	18
4.4.3	Biomasa aérea seca	18
4.4.4	pH del suelo al final del ensayo	18
4.4.5	Colonización de <i>Mortierella</i> sp.	18
4.4.6	Colonización <i>G. fasciculatum</i>	19
5	DISCUSIÓN	20
6	CONCLUSIONES	32
7	RECOMENDACIONES	33
8	REFERENCIAS	34
9	ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Concentración de las soluciones de trabajo y volúmenes requeridos para realizar la isoterma de adsorción de P en el Oxisol en el experimento No. 1	23
2	Valores de significancia (<i>P</i>) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No.1, desorción microbial de P.	23
3	Valores de significancia (<i>P</i>) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No. 2	23
4	Valores de significancia (<i>P</i>) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No. 3	23
5	Valores de significancia (<i>P</i>) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No. 4	24
6	Valores de significancia (<i>P</i>) correspondientes a las fuentes de variación para las variables de estudio del experimento No. 4	24

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Isoterma de adsorción de P en un Oxisol de Santander de Quilichao (Cauca).	25
2	Desorción de P de un Oxisol de Santander de Quilichao con presencia (MSP+) y ausencia (MSP-) del hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp.	25
3	Concentración de P en el medio de cultivo en función de la cantidad de RP aplicada usando como fuente RP de Huila inoculado con el hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp. e incubado por 7 días	26
4	pH final del medio de cultivo en función de la cantidad de RP aplicada usando como fuente RP de Huila inoculado con el hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp. e incubado por 7 días.	26
5	Biomasa del hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp. en función de la cantidad de RP aplicada, usando como fuente RP de Huila, incubado por 7 días.	27
6	Concentración de P en el medio de cultivo inoculado con el hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp. en función de la cantidad de glucosa adicionada como fuente de carbono, incubado por 7 días	27
7	pH del medio de cultivo en función de la dosis de glucosa adicionada al medio de cultivo inoculado con el hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp. e incubado por 7 días.	28
8	Biomasa del hongo solubilizador de P <i>Mortierella</i> sp. en función de la dosis de glucosa adicionada al medio de cultivo, incubado por 7 días.	28
9	Contenido de P foliar ($\mu\text{g}/\text{pínulo}$) de <i>L. leucocephala</i> a través del tiempo después del trasplante (17, 30, 45, 60, 75 días) en función de la inoculación con <i>G. fasciculatum</i> (HM) y <i>Mortierella</i> sp. (MSP).	29
10	Contenido de P foliar en los pínulos (μg) de <i>Leucaena leucocephala</i> en los días 30 y 60 (Anexos 11 y 13).	29
11	Biomasa aérea seca de <i>Leucaena leucocephala</i> en función de la interacción entre el hongo micorrizal y el hongo solubilizador de P (HMxMSP).	30
12	pH del suelo rizosférico en función de la interacción entre el hongo micorrizal y el hongo solubilizador de P (HMxMSP, izquierda) y la interacción entre el hongo micorrizal y la aplicación de P vía RP (HMxRP) al momento de la cosecha.	30
13	P total ($\mu\text{g}/\text{planta}$) absorbido en función de los factores HM, MSP y RP.	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Contenido	Página
1	Experimento 1, regresión lineal para la isoterma de adsorción de Pi en el Oxisol de Santander de Quilichao (Cauca)	44
2	Experimento 1, Modelo linearizado de Lagnmuir	44
3	Experimento 1, Análisis estadístico de la desorción con MSP+ y MSP-	45
4	Experimento 2, análisis estadísticos variable P (mg L ⁻¹) en solución	46
5	Experimento 2, análisis estadísticos variable pH del medio de cultivo	46
6	Experimento 2, análisis estadísticos variable biomasa fúngica (g)	47
7	Experimento 3, análisis estadísticos variable P (mg L ⁻¹) en solución	48
8	Experimento 3, análisis estadísticos variable pH del medio de cultivo	49
9	Experimento 3, análisis estadísticos variable biomasa fúngica (g)	50
10	Experimento 4, análisis estadísticos variable P (μg pínulo) foliar día 17	51
11	Experimento 4, análisis estadísticos variable P (μg pínulo) foliar día 30	52
12	Experimento 4, análisis estadísticos variable P (μg pínulo) foliar día 45	54
13	Experimento 4, análisis estadísticos variable P (μg pínulo) foliar día 60	54
14	Experimento 4, análisis estadísticos variable P (μg pínulo) foliar día 75	55
15	Experimento 4, análisis estadísticos variable biomasa aérea (g) de leucaena	56
16	Experimento 4, análisis estadísticos variable pH final del suelo	58
17	Experimento 4, análisis estadísticos variable colonización micorrizal (%)	59
18	Experimento 4, análisis estadísticos variable colonización <i>Mortierella</i> sp. (%)	60
19	Experimento 4, análisis estadísticos variable P total absorbido (μg/planta) al momento de la cosecha	61

RESUMEN

Se realizaron una serie de experimentos para evaluar el efecto de la inoculación combinada del hongo micorrizal *Glomus fasciculatum* (HM) y el hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. (MSP) sobre la absorción de P y el crecimiento de *Leucaena leucocephala* en un Oxisol fertilizado con roca fosfórica (RP); la capacidad de *Mortierella* sp. para desorber P previamente adsorbido en un Oxisol; el efecto de niveles crecientes de RP sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolverla bajo condiciones *in vitro* y el efecto de niveles crecientes de glucosa sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados indican que la capacidad del hongo *Mortierella* sp. para disolver RP fue controlada por la concentración de glucosa en el medio de cultivo. La concentración de glucosa de 7.5 g L^{-1} produjo disminución del pH del medio y, en consecuencia, una mayor disolución de la RP. Niveles de glucosa por encima de este nivel no aumentaron significativamente la disolución de RP. Así mismo, en otro experimento se detectó que cuando se adicionó RP a razón de 2.0 g L^{-1} se presentó una mayor reducción del pH del medio y con ello una mayor disolución de RP. Contenidos de RP en el medio de cultivo por encima o por debajo de éste nivel produjeron concentraciones de P soluble en solución más bajas.

No se detectó que el hongo *Mortierella* sp. fuera capaz de desorber P previamente sorbido en el suelo empleado, contrario a lo ocurrido en otros estudios.

En un estudio bajo invernadero se detectó que la doble inoculación con *Mortierella* sp. y *G. fasciculatum* incrementó significativamente la absorción de P y el crecimiento de *L. leucocephala* muy por encima de lo detectado con la sola inoculación con el hongo micorrizal, independiente del nivel de RP. El hongo solubilizador de P no fue capaz por sí sólo de mejorar la absorción de P y el crecimiento de leucaena con respecto al control no inoculado, ambos tratamientos permitieron que las plantas desarrollaran síntomas visuales de deficiencia de P y que exhibieran un pobre desarrollo.

PALABRAS CLAVES

Glosmus fasciculatum, *Mortierella* sp., *Leucaena leucocephala*, disponibilidad de P, Roca fosfórica, suelos fuertemente meteorizados.

ABSTRACT

A series of experiments were carried out to evaluate the effect of the dual inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and the phosphorus solubilizing fungus *Mortierella* sp. on plant P uptake and growth of *Leucaena leucocephala* grown in an Oxisol fertilized with graded amounts of rock phosphate (RP); the capacity of *Mortierella* sp. to desorb P previously sorbed on the Oxisol; the effect of increasing levels of RP on the capacity of *Mortierella* sp. to solubilize RP under *in vitro* conditions and, the effect of increasing levels of glucose on the capacity of *Mortierella* sp. to solubilize RP under *in vitro* conditions.

Results indicate that the capacity of the fungus *Mortierella* sp. to dissolve RP was controlled by the level of glucose in the medium growth. The glucose concentration of 7.5 g L⁻¹ produced a reduction in the pH of the medium growth and, consequently, a higher solubilization of RP. Levels of glucose above this concentration did not increase significantly the RP dissolution. Similarly, in another experiment it was detected that when RP was added to the growth medium at 2.0 g L⁻¹ there was a higher reduction on the pH of the growth medium, which produced a higher dissolution of RP by *Mortierella* sp. Levels of RP above or below that level produced levels of soluble P lower.

There was not evidence to support that *Mortierella* sp. can desorb P from sorbing sites in the soil.

In the study under greenhouse conditions it was detected that the dual inoculation with *Mortierella* sp. and *G. fasciculatum* significantly increased the plant P uptake and growth of *L. leucocephala* above those obtained with the sole mycorrhizal inoculation, regardless the RP level added (even in the absence of RP). The P solubilizing fungus did not increase the plant P uptake and growth over the uninoculated control, both treatments produced plants with poor growth and exhibited visual symptoms of P deficiency.

KEY WORDS

Glosmus fasciculatum, *Mortierella* sp., *Leucaena leucocephala*, availability of P, phosphorus rock, highly weathered soils

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Los suelos fuertemente meteorizados de los trópicos y subtropicos (Guppy *et al.* 2005), ubicados en la zona de vida de bosque húmedo tropical (Lynch & Brown 2008), se caracterizan por la baja disponibilidad de nutrientes y condiciones de acidez ($\text{pH} < 6.0$) (ICA 1992; Jaramillo *et al.* 1994). La limitada productividad agrícola de estos suelos en buena parte se debe a la baja disponibilidad de fósforo (P) en la solución del suelo (Lynch & Brown 2008; Guppy *et al.* 2005; Boul & Eswaran 2000; Sánchez & Salinas 1983).

Estos suelos se destacan por la alta capacidad para fijar P (Lynch & Brown 2008) en la superficie de los minerales secundarios que lo conforman (caolinita, gibsita, ferrihidrita, goetita, hematita, pirolusita y anastasa) (Boul & Eswaran 2000; Fontes & Weed 1996; Sparks 1995; Dixon & Weed 1989; Lins & Cox 1989), además de la precipitación del P con iones de $\text{Fe}(\text{OH})_x^{(3-x)+}$ y $\text{Al}(\text{OH})_x^{(3-x)+}$ libres en la solución del suelo, hacen que éste forme complejos muy insolubles y estables a pH bajos (Lynch & Brown 2008; Sparks 1995; Dixon & Weed 1989). La fuerte fijación del P aplicado limita la disponibilidad de P para las plantas, resultando en una disminución de la productividad (Guppy *et al.* 2005).

Se pretende aplicar fertilizantes fosfóricos para alcanzar y mantener concentraciones adecuadas de P en la solución del suelo. Esto, puede ser logrado al aplicar altas dosis de fertilizantes solubles (Sánchez & Salinas 1983). En los Oxisoles se presentan problemas como, altas tasas de aplicación de fertilizantes fosfóricos, son necesarias para poder llegar a tener niveles de suficiencia del elemento en la solución del suelo (Kirkby & Johnston 2008); es el insumo individual más costoso requerido para las sabanas de pasturas mejoradas en Ultisoles y Oxisoles (CIAT 1979); baja eficiencia obtenida con la fertilización fosfórica (Osorio & Pérez 2000); se corren riesgos ambientales de acumular fósforo en los cuerpos de aguas (Stewart & Howell 2003), lo anterior debido a la alta tasa de fertilizantes P que requieren los Oxisoles (Sánchez & Salinas 1983).

Muchos estudios muestran una disminución en la sorción de P, incrementando la concentración de P en la solución de suelo, después de pequeñas adiciones de P en suelos fuertemente meteorizados, cuando se aplica materia orgánica (Guppy *et al.* 2005). Un factor muy importante que se debe considerar en la determinación de la conveniencia de aplicar las fuentes de P es el valor residual (CIAT 1982). A diferencia de los nutrientes móviles en el suelo, el P permanece en la vecindad del sitio de aplicación por largos períodos de tiempo y se mantiene disponible para proporcionar una porción de los requerimientos de cultivo durante una serie de períodos de cultivo (Sánchez 2007; CIAT 1982).

1.2 Justificación

Thies & Grossman (2006), hablan acerca del interés creciente por los microorganismos de la rizosfera, para aumentar o manipular poblaciones que se encuentran allí. Estos autores, reconocen la importancia de la microflora del suelo en el mantenimiento de la fertilidad del suelo, también recomiendan tener practicas que ayuden a mejorar la sobrevivencia y función de los microorganismos benéficos del suelo.

El manejo de la rizosfera puede ser integrado como una estrategia, que favorece la movilización y adquisición de nutrientes para un mejor crecimiento vegetal (Römheld & Neumann 2006).

La limitada disponibilidad de P en los suelos del trópico fuertemente meteorizados (Oberson *et al.* 2006), sugiere practicas de manejo como el empleo de roca fosforica (RP) en estos suelos (Sánchez 2007) por las características químicas de la RP (Rajan *et al.* 1996) y el empleo de hongos micorrizales (HM) (Barea *et al.* 2008; Habte 2006). Los HM son una alternativa biológica para mejorar la absorción de P por las plantas. Éstos mejoran la absorción de P, además de Ca, Mg, Cu, Zn (Whitehead 2008; Deacom 2006; Gregory 2006; Soedarjo & Habte 1995; Habte & Soedarjo 1996), lo que estimula el crecimiento y la nutrición en plantas inoculadas como café (*Coffea arabica* variedades Colombia y Caturra) (Jaramillo 2006), uchuva (*Physalis peruviana* L.) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) (González 2006), aguacate (*Persea americana* Mill.) (Montoya 2008), leucaena (*Leucaena leucocephala* [Lam.] de Wit.) (Soedarjo & Habte 1995; Osorio 2003), entre muchas otras.

Estos hongos impactan positivamente el crecimiento y la nutrición de las plantas ya que el micelio del hongo se convierte en una extensión de las raíces (Barea *et al.* 2008), ayudando a explorar un volumen de suelo mayor que el que puede explorar la raíz (Vosátka & Albrechtova 2009), de otro lado, el micelio alcanza micrositios donde los pelos de las raíces no logran llegar; absorben concentraciones de P y otros nutrientes (agua, entre otros) mucho mas bajas, que las que absorben las raíces de las plantas; la movilidad del P es mucho mayor dentro del micelio del hongo que en el suelo (Bowen & Rovira 1999; Hinsinger 1998; Barber 1995; Bolan 1991).

Los microorganismos solubilizadores de P (MSP) mejoran la disponibilidad de P en la solución del suelo y, por ende, favorecen la absorción de P en las plantas (Whitelaw 2000; Osorio & Pérez 2000; Kucey & Legget 1989).

Osorio (2008) en una serie de experimentos demostró el efecto sinérgico de inocular conjuntamente MSP (*Mortierella* sp.) y HM (*Glomus aggegatum*) en plantas de leucaena en diferentes suelos. De igual manera, Zaidi & Khan (2006) con una triple inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (fijador de nitrógeno), *Bacillus subtilis* (MSP), *Aspergillus awamori* (MSP) y *Glomus fasciculatum* (HM), encontraron efectos positivos en el crecimiento de *Vigna radiata* L. Wilczek, cuando crece en un suelo deficiente en P y fertilizado con RP.

La asociación de los HM con los MSP puede ser crítica, especialmente en suelos que contienen muy bajas concentraciones de P en la solución del suelo (Habte 2006). La inoculación dual de HM y MSP muestra ser efectiva en aumentar la absorción de P (Osorio 2008; Osorio & Pérez 2000). Esta interacción en suelos altamente meteorizados puede mejorar la disponibilidad de P en la solución del suelo, la absorción de P y el crecimiento experimental de plantas, cuando se adicionan al suelo formas de baja solubilidad en suelos fuertemente fijadores.

Reducir los costos de la fertilización de P con el uso de RP, puede ser una práctica agronómica más adecuada en los suelos ácidos (Sánchez 2007; López & Nieves 1993, Sánchez & Salinas 1983). La RP se caracteriza por tener baja reactividad, baja disolución y lenta liberación de P (Rajan *et al.* 1996; Hammond *et al.* 1986; Khasawneh *et al.* 1979;). Esta situación se mejora cuando se tienen en cuenta los microorganismos del suelo capaces de disolver RP (Ramírez 2005; Whitelaw 2000; Osorio & Pérez 2000). Adicionalmente, esto disminuye los riesgos ambientales que se pueden tener en la contaminación de los cuerpos de agua (Smith & Moore 2005; Stewart & Howell 2003).

Los fertilizantes fosfóricos son un recurso limitado y costoso, muchos agricultores no pueden acceder a él (Steen 1997). Es imperativo, que las personas que trabajan con vegetales exploren e identifiquen los mecanismos que mejoran el uso eficiente del P, para diseñar estrategias de aprovechamiento que aumenten la adquisición y eficiencia del P en ambientes de baja disponibilidad (Vance 2008). Los esfuerzos para mejorar la disponibilidad del P para las plantas son urgentemente necesitados para mantener e incrementar económica y ambientalmente los cultivos agrícolas sostenibles (Vance 2008).

La adición de fertilizantes fosfóricos es una práctica común en países en desarrollo, pues, es cuestionable la sostenibilidad económica de esta actividad (Abelson 1999). En muchos países en desarrollo, especialmente en África, el uso de fertilizantes es insignificante (World Bank 2004). Lynch (2007), sugiere que el desarrollo de sistemas de cultivos con gran productividad en suelos de baja disponibilidad de P puede mejorar la sostenibilidad y seguridad alimentaria global.

La respuesta de los ecosistemas terrestres al cambio climático global dependerá de las interacciones de las variables que cambian el clima, sobre las limitaciones edáficas para la producción vegetal, incluyendo el P (Lynch & St. Clair 2004). La adaptación de las plantas a la baja disponibilidad de P, es por lo tanto de considerable interés en las Ciencias Agrarias (Lynch & Brown 2008).

Se ha estimado que la población humana crecerá 2,3 billones para el 2020 y el doble para el año 2050 (Maarten & David 2003; Keeney 1997). Se espera que la demanda de nutrientes y granos sea el triple (Keeney 1997). Shaviv (2001) sostiene que la carga de nutrientes por unidad de área se incrementa firmemente. Todo esto implica que la producción de alimentos debe ser mucho más intensiva y eficiente que antes (Maarten & David 2003).

1.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.3.1 Experimento 1

Mortierella sp. tiene la capacidad de desorber fósforo previamente adsorbido y con ello aumentar la concentración de fósforo en la solución del suelo, dicha capacidad esta condicionada por la cantidad de fósforo adsorbido por el suelo.

1.3.2 Experimento 2

La capacidad de *Mortierella* sp. para disolver roca fosfórica y aumentar la concentración de fósforo en el medio de cultivo dependen de la disminución del pH en el medio, las variables están en función de la dosis de roca fosfórica adicionada a este.

1.3.3 Experimento 3

La capacidad de *Mortierella* sp. para disolver la roca fosfórica mediante la reducción del pH del medio cambia en función de la concentración de glucosa.

1.3.4 Experimento 4

La doble inoculación fúngica del suelo con *Glomus fasciculatum* y *Mortierella* sp. favorece la absorción de fósforo, y el crecimiento de *L. leucocephala* en un Oxisol fertilizado con roca fosfórica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación combinada de *Glomus fasciculatum* (HM) y *Mortierella* sp. (MSP) sobre la disponibilidad de P en la solución del suelo, la absorción de P y crecimiento de *Leucaena leucocephala* en un Oxisol fertilizado con roca fosfórica.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1.4.2.1 Evaluar la capacidad de solubilización de P previamente adsorbido en un Oxisol
- 1.4.2.2 Evaluar el efecto de niveles crecientes de roca fosfórica sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolverla bajo condiciones *in vitro*
- 1.4.2.3 Evaluar el efecto de niveles crecientes de glucosa sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*.
- 1.4.2.4 Evaluar el efecto de la doble inoculación del suelo con *Glomus fasciculatum* y *Mortierella* sp. sobre la disponibilidad del P en el suelo, la absorción de P y el crecimiento de *Leucaena leucocephala*, en un Oxisol fertilizado con niveles crecientes de roca fosfórica.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Suelos altamente meteorizados

La distribución geográfica de suelos fuertemente meteorizados (Oxisoles y Ultisoles) se relaciona principalmente con materiales geológicos y superficies geomorfológicas estables en las regiones intertropicales (Boul & Eswaran 2000). Las propiedades químicas están dictadas por la baja carga de las arcillas (Yu 1997). Los suelos ácidos presentan un $\text{pH} < 6,5$ (Zapata 2004). La fracción arena y limo contienen pocos minerales meteorizables (Jaramillo *et al.* 1994). Los Oxisoles tienen valores relativamente bajos de intercambio de cationes (Dixon & Weed 1989), muchos tienen baja saturación de bases (Jaramillo *et al.* 1994). Los escenarios pedogenéticos son variados, pero relacionados con la pérdida de silicatos y concentración de óxidos de Fe y Al (Jaramillo *et al.* 1994).

Los suelos fuertemente meteorizados y/o suelos ácidos, frecuentemente presentan minerales en la fracción arcillosa ($< 2 \mu\text{m}$), de óxidos u óxidos-hidratados de Fe, Al y Si (Dixon & Weed 1989). Los minerales arcillosos asociados con los silicatos son la caolinita [$\text{Si}_4\text{Al}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$], generalmente desordenada y recubierta con altos contenidos de Fe (Sparks 1995). Los minerales comunes asociados con los óxidos de hierro (Fe) son: Ferrihidrita ($\text{Fe}_{10}\text{O}_{15}9\text{H}_2\text{O}$), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y magnetita (Fe_3O_4) (Herbillon 1988; Sparks 1995). Los minerales de Al generalmente son la gibsita ($\gamma\text{-Al}(\text{OH})_3$) (Eswaran *et al.* 1977). Los óxidos de manganeso son la pirolusita ($\beta\text{-MnO}_2$). En la fracción arena se encuentra en gran cantidad el cuarzo y óxidos de titanio (anastasa y rutelio (TiO_2)) (Sparks 1995), que son muy resistentes a la meteorización (Herbillon 1988). Otros minerales que se han reportado en la superficie de los Oxisoles son la clorita o minerales hidróxidos interlaminares (Boul & Eswaran 2000). Eswaran *et al.* (1977), encontraron diferentes minerales de Fe y Al cristalinos presentes en la fracción fina del limo.

Para Boul & Eswaran (2000) la mineralogía de los Oxisoles, particularmente de aquellos con altas cantidades de sesquióxidos, específicamente óxidos y óxidos-hidratados de Fe en la fracción fina del suelo, imparten algunas propiedades únicas a estos suelos.

Moraghan & Mascagni (1991), mencionan que se pueden esperar deficiencias de Zn, Cu, Mn, B y Mo, ya que la disponibilidad de estos nutrientes depende de los valores de pH. La disponibilidad de nutrientes de los Oxisoles es baja (Melgar *et al.* 1992; Moraghan & Mascagni 1991), lo anterior no significa que sean infértiles para un cultivo individual pero más bien su inhabilidad para sostener continuamente la producción sin fertilización. Cuando las limitaciones naturales de acidez y bajo contenido de nutrientes son superadas por adición de cal y fertilizantes, se presentaran importantes producciones en los Oxisoles (Boul & Eswaran 2000).

Las arcillas de los Oxisoles tienen carga variable (Fey & Le Roux 1976) y gran superficie específica, propiedades muy relacionadas con su capacidad para fijar P (Bigham *et al.* 1978; Fontes 1988). La superficie específica de la caolinita en los Oxisoles es alrededor de $60 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (Boul & Eswaran 2000).

Con frecuencia los suelos tropicales son deficientes en P (Winch 2006). Los Oxisoles presentan una muy baja disponibilidad de P o fósforo inorgánico (Pi) en la solución del suelo (Daza *et al.* 2006; Trakoonyingcharoen *et al.* 2005), destacándose por su alta tasa para fijar fertilizante fosfórico en la superficie de los minerales secundarios (Boul & Eswaran 2000; CIAT 1983; Sánchez & Salinas 1983). Cuando tienen substanciales contenidos de óxidos de Fe en el horizonte superficial (Boul & Eswaran 2000; Smyth & Cravo 1992). Los altos contenidos de iones de $\text{Fe}(\text{OH})_x^{(3-x)+}$ y $\text{Al}(\text{OH})_x^{(3-x)+}$ libres en la solución del suelo reaccionan con el Pi y hacen que este se precipite para formar P-Fe y P-Al, complejos muy estables a $\text{pH} < 5,5$. El rango de pH en el cual el P es más disponible para las plantas es de 5,5 a 6,5. (Winch 2006).

2.2 Hongos micorrizales

Los hongos micorrizales (HM) tienen asociaciones simbióticas con las raíces de muchas plantas para poder completar su ciclo de vida (Deacom 2006), son microorganismos obligados (Deacom 2006; Gregory 2006). Pertenecen al Phylum Glomeromycota, Orden Glomales, el cual consiste de cinco familias y siete géneros reconocidos por las características de sus esporas (Morton 2009; Dugan 2006). Los HM son uno de los siete tipos de micoriza que se conocen, éstos se asocian con el 80% de las especies de plantas conocidas (Peterson *et al.* 2004).

De acuerdo con Dalpé *et al.* (2005) y Peterson *et al.* (2004), el ciclo de vida se puede generalizar en siete pasos que consisten en la emergencia o germinación de la espora, crecimiento y ramificación de la hifa, contacto con la raíz hospedante y formación del apresorio, penetración de la epidermis y la pared celular, ramificación de la hifa intraradical y la penetración de las células corticales, formación de los arbusculos y el crecimiento de la hifa extra radical y la formación de esporas.

Habte (2006) menciona el papel de los HM en la nutrición de las plantas, propiedades físicas del suelo y la protección de las plantas frente a factores bióticos y abióticos, los efectos de la aplicación de HM y algunos efectos nocivos de los HM. Rivera & Fernández (2006) presentan una completa información acerca de la inoculación y manejo de HM dentro de los ecosistemas tropicales. Bowen & Rovira (1999) hablan a cerca de la densidad de la población y la colonización en los inóculos microbiales, refiriéndose a los HM.

Es amplia la literatura referente al benéfico de los HM para mejorar la absorción de P, estimulando el crecimiento y la nutrición en plantas cultivadas, forestales y pasturas, entre otras. Estos hongos impactan positivamente el crecimiento y la nutrición de los vegetales con los que tienen la simbiosis puesto que el micelio del hongo se convierte en una extensión de las raíces, ayudando a explorar un volumen de suelo mayor que el que puede explorar la raíz; de otro lado, el micelio alcanza micrositios donde los pelos de las raíces no logran llegar; las células de las hifas absorben concentraciones de P y otros nutrientes (agua, entre otros) mucho más bajas que las que absorben las raíces de las plantas; la movilidad del P es mucho mayor dentro del micelio del hongo que en el suelo (Barea *et al.* 2008; Webster & Weber 2007; Peterson *et al.* 2004; Bolan 2001; Kendrick 2000).

2.3 Solubilización microbial de P

Beauchamp & Hume (1997) y Bowen & Rovira (1999), mencionan la existencia de microorganismos capaces de solubilizar fósforo a formas disponibles para las plantas. Muchas bacterias (Rodríguez *et al.* 2006), hongos (Whitelaw 2000), levaduras y especies de actinomicetes (Atlas & Bartha 1998; Beauchamp & Hume 1997), que han sido aislados del suelo y la rizósfera, en cultivos puros, son capaces de solubilizar y captar el P soluble (Kucey & Leggett 1989). Ramírez (2005) aisló cepas de *Bacillus* sp. de la rizósfera de banano y plátano de la región de Urabá (Colombia) capaces de solubilizar RP como única fuente de P bajo condiciones *in vitro*. Se ha observado, una alta proporción de microorganismos solubilizadores de P concentrados en la rizósfera de las plantas (Whipps & Lynch 1986; Bowen & Rovira 1999).

Muchos microorganismos del suelo pueden solubilizar compuestos de Pi del suelo (Bowen & Rovira 1999; Zahir *et al.* 2003), reversando así los procesos de fijación de P (Rao 1992). Bacterias del suelo de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, y *Bacillus* son particularmente activas como solubilizadores de P (Kim *et al.* 1998ab). Los hongos del suelo, especialmente aquellos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* (Whitelaw 2000) y *Mortierella* (Whitelaw 2000; Osorio 2003) han demostrado ser efectivos MSP. Aunque las bacterias han recibido gran atención, Kucey (1983) indicó que los hongos son más efectivos solubilizando Pi.

Whitelaw (2000) revisó ampliamente los hongos con habilidad para solubilizar P, y muestra una gran diversidad con esta capacidad. *Penicillium* y *Aspergillus* spp son los hongos de la rizósfera o del suelo que solubilizan P más frecuentemente encontrados (Whitelaw 2000; Kucey 1983, Molla *et al.* 1984;). Osorio (2010 sin publicar) muestra hifas de *Aspergillus* sp. en medio líquido atacando partículas de RP.

Osorio (2003), aisló varios MSP de la rizósfera de *Leucaena leucocephala* que se encontraban creciendo naturalmente en tres suelos de Hawaii (Andisol, Oxisol y Vertisol), encontró gran cantidad de MSP, el más efectivo fue un hongo identificado como *Mortierella* sp. el cual incremento la absorción de P en leucaena. Este autor, sugiere un efecto sinérgicos con la inoculación combinada de *Mortierella* sp. (MSP) y un HM (*Glomus aggregatum*).

Debido al fácil aislamiento de microorganismos con aparente alta capacidad para solubilizar P, muchos estudios se han conducido en investigar el efecto de la inoculación con solubilizadores de P en el crecimiento de plantas y absorción de P (Marschner 2008). Muchos de ellos con resultados favorables (Zaidi *et al.* 2009). Marschner (2008), advierte sobre la precaución que se deben tener en la evaluación de los microorganismos en las pruebas *in vitro*. Esta misma autora, sostiene que los P-Ca son disueltos por la liberación de protones, pero la liberación de protones no es efectiva para movilización de P-Al o P-Fe o P adsorbido a óxidos de Fe y/o Al. Los ácidos orgánicos son efectivos en quelatar iones de Fe y/o Al con lo cual se liberaría Pi (Marschner 2008; Guppy 2005). En algunos casos, probablemente, respuestas negativas a las inoculaciones se pueden deber al pobre crecimiento y sobrevivencia de los MSP, causada por la falta de nutrientes y/o competencia con la microflora nativa (Marschner 2008).

Combinaciones de microorganismos con diferentes características, como solubilización de P combinada con fijación de N₂ y con HM, presentan mejores respuestas que la sola inoculación con solubilizadores de P (Marschner 2008).

2.4 Mecanismos de solubilización microbial de P

Varios mecanismos se proponen para explicar la solubilización microbial de compuestos inorgánicos de P, estos consisten en la producción de ácidos inorgánicos y orgánicos durante la descomposición de la materia orgánica (Iyamuremye *et al.* 1996; Marschner 2008; Bar-Yosef *et al.* 1999); excreción de protones debido a la asimilación de NH₄⁺ por los microorganismos (Kucey 1983; Roos & Luckner 1984; Abd-Alla 1994; Whitelaw 2000); desorción de iones P de los sitios de adsorción (He & Zhu 1997 y 1998); quelatación de Al y Fe (Iyamuremye *et al.* 1996; Marschner 2008; Bar-Yosef *et al.* 1999) y competencia de los aniones orgánicos producidos por los MSP con los iones fosfato por los sitios de adsorción en las superficies de los minerales arcillosos del suelo (Bolan *et al.* 1994)

Lynch & Whipps (1990), encontraron que las plantas pueden liberar a la rizósfera hasta un 40% del carbón total fijado por fotosíntesis. La descomposición de los exudados radiculares y mudas de la epidermis pueden incrementar la disponibilidad de P en la rizósfera por la producción de ácidos orgánicos como resultado de la descomposición microbial de la materia orgánica (Marschner 2008).

En muchas bacterias la capacidad para disolver P mineral esta relacionada con la producción de ácido orgánico (Rodríguez & Fraga 1999). Goldstein (1996) propuso la directa oxidación de la glucosa a ácido glucónico como el mayor mecanismo para la solubilización de P en bacterias Gram negativas. Rodríguez *et al.* (2006), referencian diferentes trabajos de clonación de genes como *mps*, *gabY*, *pKG3791* y *pK1M10* involucrados en la solubilización de P mineral, aislados de *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens*, *Rahnella aquatilis*, respectivamente. Goldstein & Liu (1987) clonaron el gen *mps* de la bacteria Gram negativa *Erwinia herbicola* en *E. coli*, logrando su expresión en la producción de ácido glucónico y confiriéndole a *E. coli* HB101 la habilidad para solubilizar hidroxipatita.

Halderk *et al.* (1990), evaluaron la habilidad de 23 cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* para disolver RP. Estos autores, mediante análisis cromatográficos encontraron que el ácido 2-ketoglucónico fue producido por *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* BICC635 el más efectivo solubilizador de RP; además, encontraron que no todas las cepas produjeron el mismo ácido orgánico.

Algunos de los ácidos orgánicos asociados comúnmente con la solubilización microbial de P son: glucónico (Rodríguez *et al.* 2006; Bar-Yosef *et al.* 1999), oxálico, cítrico (Kim *et al.* 1997; Kucey & Leggett 1989; Osorio 2008), láctico, tartárico y aspártico (Venkateswardu *et al.* 1984). Estos ácidos son productos del

metabolismo microbial, en algunos casos por respiración oxidativa o por fermentación de sustratos carbonáceos (p.e. glucosa) (Atlas & Barta 1998; Prescott *et al.* 2004; Mathews *et al.* 2002). Se acepta que las reacciones de solubilización de P ocurren en la rizósfera donde los compuestos carbonáceos son liberados y donde el P solubilizado puede ser tomado por la raíz o por el sistema micorrizal. Osorio & Habte (2009), recientemente revisaron el tema de los hongos micorrizales y microorganismos solubilizadores de P, para mejorar el crecimiento vegetal y absorción de P en suelos trópicos.

2.5 Relaciones en la rizósfera

Para las plantas absorber agua y nutrientes a través de sus raíces, ellas deben fijar CO₂ en sus hojas para soportar el metabolismo necesario para mantener esta absorción (Primavesi 2006). Para este estudio, solo se consideran la capacidad de solubilización y aumento en la absorción de nutrientes como efectos benéficos por microorganismos asociados con la raíz, como lo proponen Thies & Grossman (2006).

Las plantas depositan entre 1 y 25% de su producción fotosintética neta, la cual incluye raíces muertas, muda de células epidermales de la raíz, y compuestos solubles (Uren 2007). Una gran producción de exudados radicales como azúcares, ácidos orgánicos, aniones o aminoácidos son fácilmente degradados por los microorganismos en la rizósfera, resultando en una alta densidad microbial y actividad en la rizósfera (Neumann & Römheld 2007) La rizósfera es un hábitat con gran cantidad de fuentes de carbono fácilmente disponibles, esta es un sitio de intensa competencia entre microorganismos (Whipps & Lynch 1986).

Los microorganismos pueden aumentar o disminuir la disponibilidad de P para las plantas por solubilización de P, la absorción de P en las plantas puede ser disminuida por la competencia con la biomasa microbial, causando una inmovilización neta hasta que estos microorganismos no liberen el P orgánico (Marschner 2008) y disminuya la población microbial.

Marschner (2008), refiriéndose al tema de los microorganismos rizosféricos en relación a la absorción de P por las plantas, anota que, bajo condiciones de pocos nutrientes y altas tasas de crecimiento microbial, la solubilización de P se reduce fuertemente. Cuando la rizósfera no es rica en nutrientes, los microorganismos aislados por su capacidad para solubilizar P *in vitro* pueden no ser efectivos en la rizósfera debido a la falta de carbono. Adicionalmente, la solubilización de P puede ser transitoria por la formación de compuestos de P poco solubles (Delvasto *et al.* 2006) y la inmovilización de P por los microorganismos (Hoberg *et al.* 2005).

2.6 Función del P en los vegetales

El P es un nutriente requerido en muchos compuestos en las células y organelos. Estos compuestos están asociados con numerosos componentes del metabolismo como azúcares fosfato, ácidos nucleicos (material genético), nucleótidos, coenzimas, fosfolípidos (importante en la estructura de las membranas), trifosfonucleótidos (asociados con la transferencia de energía) (Rychter & Rao 2005), los fosfatos orgánicos e inorgánicos también sirven como tampón en el mantenimiento del pH celular (Sánchez 2007). Los enlaces, éster covalentes son de alta energía, cuando son sintetizados, almacenan energía y, cuando son hidrolizados participan en reacciones alternativas como la adición de P a otras moléculas, liberando la energía acumulada (Rychter & Rao 2005).

La restricción en el suministro de Pi resulta en numerosas perturbaciones en el crecimiento y desarrollo vegetal además de afectar fuertemente la producción. Deficiencias de P por largos periodos afectan los procesos celulares y subcelulares en todos los niveles de organización de los órganos (Rychter & Rao 2005). El crecimiento de muchas plantas se reduce por deficiencias de P, el área foliar, número de hojas, producción de materia seca por planta son variables muy sensibles a deficiencias de P (Rychter & Rao 2005).

El P es utilizado en forma hidratada u oxidada como anión ortofosfato. Las plantas absorben H₂PO₄⁻ o HPO₄²⁻ (Whitehead 2008). A pH 6,0 cerca del 94% del P está en forma de H₂PO₄⁻ y el resto (6%) como HPO₄²⁻, pero a pH 7,0 aproximadamente el 60% está como H₂PO₄⁻ y el 40% como HPO₄²⁻ (Lindsay *et*

al.1989). Bajo ciertas condiciones las plantas pueden absorber P orgánico, incluyendo ácidos nucleicos. Cuando el Pi entra en las células de las raíz es combinado con moléculas orgánicas y transportado al tallo (Sánchez 2007). El ácido fítico, el éster de fosfato y fosfato de *myo*-inositol, son la reserva de P más común en las semillas (Sánchez 2007). El P total en los tejidos de las plantas tiene un rango entre 0,1-1% (Sánchez 2007).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (6° 15' N y 75° 34' W, con 1450 m de altitud). La muestra del suelo utilizado corresponde al horizonte A (0 a 20 cm) de un Oxisol de la estación experimental del CIAT en Santander de Quilichao (Cauca), cedido amablemente por el Dr. Edgar Amezcuita.

3.2 Análisis de suelos

El suelo fue secado al aire, tamizado entre 2 y 0,5 mm y se luego se le determinó: Textura mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos: A: 48%, L: 18% y Ar: 34%, clase textural FArA. pH en agua (masa: volumen 1:2): 4,3. Conductividad eléctrica en la pasta saturada: 0,30 ds m⁻¹. Al intercambiable en KCl 1M: 5,5 cmol_c kg⁻¹. Ca, Mg y K extraídos con acetato de amonio 1M: 1,2, 0,6 y 0,41 cmol_c kg⁻¹, respectivamente. CIC-efectiva mediante la suma de cationes de cambio: 7,7 cmol_c kg⁻¹. Fe, Mn, Cu y Zn extraídos con la solución de Olsen (NaHCO₃ 0,5 M)- EDTA: 277, 29, 2 y 2 mg kg⁻¹, respectivamente. B extraído con agua caliente: 0,3 mg kg⁻¹. NO₃⁻ extraído con sulfato de aluminio 0,025 M: 2 mg kg⁻¹. SO₄⁻² extraído con fosfato monocálcico 0,008 F: 23 mg kg⁻¹. NH₄ extraído con KCl 1 M: 14 mg kg⁻¹. P extraído con la solución de Bray II: 11 mg kg⁻¹. P soluble a través del método de Brown (CaCl₂·2H₂O 0,01 M): 0,033 mg P L⁻¹. Contenido de materia orgánica mediante el método de Walkley & Black: 11%. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

3.3 Experimento 1. Desorción microbial de P

El hongo *Mortierella* sp. fue obtenido de la colección del Laboratorio de Microbiología del Suelo, el cual se multiplicó en cajas de Petri que contenían un medio de cultivo compuesto por KH₂PO₄ 0,5 g; MgSO₄·7H₂O 0,2 g; NaCl 0,1 g; manitol 10 g; agar 15 g por litro. El pH del medio se ajustó a 6,0. El hongo creció a 28°C durante 10 días, luego se removió asépticamente el soma (micelio) y se suspendió en CaCl₂·2H₂O 0,01M en frascos de vidrio. El hongo permaneció en nevera a 4°C para ser usado en los diferentes experimentos.

Se determinó la capacidad de sorción de P del Oxisol a través de una isoterma de adsorción (Fox & Kamprath 1970). Este método consiste en tomar tres g de suelo (base seca) en tubos plásticos de centrifuga con capacidad para 50 mL, luego cada tubo recibe 30 mL de una solución de CaCl₂·2H₂O 0,01 M que contiene cantidades crecientes de KH₂PO₄ (Tabla 1). En este experimento se emplearon 12 niveles de P aplicado (0, 50, 83, 100, 183 250, 383, 500, 633, 833, 900, 1000 mg kg⁻¹), con 10 repeticiones por nivel, el total de las unidades experimentales (ue) fue 120. Se utilizó un diseño completamente al azar.

Los tubos de centrifuga y sus contenidos fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 1,2 kg cm⁻² para eliminar la actividad microbial sobre las muestras. Los tubos, en disposición horizontal, se agitaron recíprocamente a razón de 100 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos cada 12 horas por siete días de incubación, para permitir alcanzar el equilibrio. Luego los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se pasó a través de papel filtro con un tamaño de poro de 2 μm. En algunos casos fue necesario diluir (1:10) las muestras de los niveles 633 a 1000 mg P kg⁻¹. Finalmente, se determinó la concentración de P en 10 mL de solución, para esto se empleó el método de azul-molibdato (Murphy & Riley 1962).

Una vez se removió el sobrenadante, las muestras de suelo en los tubos de centrifuga se enjuagaron en tres ocasiones sucesivas con 30 mL de CaCl₂·2H₂O 0,01M. En cada enjuague los tubos se dispusieron horizontalmente en un agitador recíproco durante 4 minutos, luego se centrifugaron por cinco minutos a 5000

rpm y se eliminó el sobrenadante. Al final de los enjuagues las muestras se secaron en los tubos de centrifuga. El P que permaneció en la matriz del suelo se consideró fuertemente adsorbido.

Los datos se sometieron al modelo linearizado de Lagmuir (Bohn *et al.* 1985) con el fin de determinar la máxima capacidad de fijación de P y la fuerza de adsorción del suelo (Anexo 2).

Para evaluar la desorción biológica de P, las muestras se sometieron al método desarrollado por Osorio (2008). Para este propósito se adicionaron a cada tubo 29 mL de una solución que contenía 1,0 g de NaCl; 0,2 g de CaCl₂·2H₂O; 0,4 g de MgSO₄·7H₂O; 1,0 g de NH₄NO₃ y 10 g de glucosa L⁻¹. Los tubos y sus contenidos se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1,2 kg cm⁻² por 20 minutos. Posteriormente, los tubos se inocularon con 1 mL de una suspensión que contenía CaCl₂·2H₂O 0,01M y los propágulos del hongo *Mortierella* sp. 7x10⁹ UFC por mL (Capuchino & Sherman 1998), conocido por su capacidad para solubilizar P. Los tubos no inoculados, solamente recibieron 1 mL de solución de CaCl₂·2H₂O 0,01M. Los tubos se agitaron permanentemente a 100 rpm a temperatura ambiente (25-28°C) durante siete días. Luego del periodo de incubación las muestras se centrifugaron (5000 rpm por 10 minutos), filtraron doblemente a través de papel filtro y membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro 2 y 0,45 µm, respectivamente). En los filtrados se midió la concentración de P como se describió anteriormente.

Con un medelo de regresion lineal ($P \leq 0,05$) se estudio la capacida de *Mortierella* sp. para desorber P previa adsorbido. Las variables independientes fueron la dosis (12 niveles, Tabla 1) y el MSP [presencia (MSP+) y ausencia (MSP-)], la variable dependiente fue P en solución (mg L⁻¹). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Se hizo una separación de medias con la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD sigla en ingles) para cada regresion (MSP+ y MSP-). La variable dependiente fue transformada con LN (x), para verificar el cumplimiento de los supuestos del modelo de regresión (Tabla 2). La normalidad ($P \geq 0,05$) se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk 1965) sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad ($P \geq 0,05$) con la prueba de Brown & Forsythe's (Tabla 2). Para los análisis estadísticos se uso el software SAS versión 9.1.3.

3.4 Experimento 2. Efecto de niveles crecientes de RP sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*.

En este ensayo, se evaluó el efecto de niveles crecientes de RP sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*. Para tal fin, se preparó un medio de cultivo que contenía glucosa: 10 g; NH₄Cl: 1,34 g; KCl: 1,87g; CaCl₂·2H₂O: 0,2 g; MgSO₄·7H₂O: 0,4 g; Fe, Cu, Mn-EDTA: 28 mg; Zn-EDTA: 14 mg para preparar un litro (Osorio, 2008). 75 mL de este medio se transfirieron a elermeyer's de 250 mL. En este experimento (29 de agosto - 05 de septiembre de 2009), se adicionaron niveles crecientes de RP a razón de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 g L⁻¹. Esta RP no-acidulada tiene una concentración de 12,2% de P y su composición química es Ca_{9,69}Na_{0,22}Mg_{0,09}(PO₄)_{5,14}(CO₃)_{0,86}F_{2,34} según Chien & Hammond (1978). El pH del medio al inicio fue de 7,3. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave como se describió anteriormente.

Los medios se inocularon con 1,0 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. la cual contenia 7x10⁹ UFC por mL (Capuchino & Sherman 1998) mencionada antes. Los erlenmeyer's se incubaron y agitaron a 100 rpm a temperatura ambiente durante siete días. Luego de este periodo de incubación se determinó el pH del medio con un potenciómetro; la concentración de P (mg L⁻¹) en el medio (previamente filtrado en papel filtro y membrana de nitrocelulosa, ya mencionadas) a través del método del azul-molibdato (Murphy & Riley 1962); y la biomasa seca (g) del hongo previa separación de la RP en el papel filtro y secado en estufa a 60°C por 24 h.

Los datos se sometieron a un análisis de regresión ($P \leq 0,05$), para lo cual las variables independientes fueron las variables medidas en función del nivel de RP. La separación de las medias se hizo con la prueba de rangos múltiples de Duncan. La normalidad ($P \geq 0,05$) se evaluó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Drezner *et al.* 2010) sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad ($P \geq 0,05$) con la prueba de Brown & Forsythe's (Tabla 3). Para los análisis estadísticos se uso el software SAS versión 9.1.3.

3.5 Experimento 3. Efecto de niveles crecientes de glucosa sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*.

Para tal fin se preparó un medio de cultivo que contenía NH₄Cl: 1,34 g; KCl: 1,87g; CaCl₂.2H₂O: 0,2 g; MgSO₄.7H₂O: 0,4 g; Fe, Cu, Mn-EDTA: 28 mg; Zn-EDTA: 14 mg para preparar un litro (Osorio, 2008). 75 mL de este medio se transfirieron a erlenmeyer's de 250 mL. En este ensayo (13-19 de septiembre de 2009) se adicionaron niveles crecientes de glucosa (Merck) a razón de 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15; 20 y 25 g L⁻¹. Con base en los resultados del primer experimento (Anexo 4), se adicionó RP a razón de 2 g L⁻¹. El pH del medio al inicio fue de 7,4. El medio contenido en los erlenmeyer's se esterilizó en autoclave como se describió anteriormente.

Los medios se inocularon con 1,0 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. antes mencionada. Los erlenmeyer's se incubaron y agitaron a 100 rpm a temperatura ambiente durante siete días. Luego de este periodo de incubación, se determinó P en el medio de cultivo con el método de azul-molibdato, pH y la biomasa seca producida por el hongo.

El experimento tuvo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por dosis de glucosa. Los datos se sometieron a un análisis de regresión ($P \leq 0,05$), para lo cual, las variables dependientes de P en solución (mg L⁻¹), y biomasa seca del hongo (g) fueron las variables medidas en función del nivel de glucosa adicionada. La separación de las medias se hizo con la prueba de rangos múltiples de Duncan. La normalidad ($P \geq 0,05$), se evaluó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Drezner *et al.* 2010) sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown & Forsythe's (Tabla 4). La variable pH del medio cultivo al final del ensayo se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis, la separación de los rangos medios se hizo utilizando la prueba descrita por Dunn (1967) (Sheskin 2000). Para los análisis estadísticos se usó el software SAS versión 9.1.3.

3.6 Experimento 4. Efecto de la doble inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de P sobre la absorción de P y el crecimiento de *Leucaena* en casa de malla.

Una muestra del horizonte A (0 a 20 cm) de un Oxisol de la estación experimental del CIAT, Santander de Quilichao (Cauca) se tamizó a 4 mm y posteriormente se encaló con CaO para llevar el suelo a pH de 5,3. Para tal fin, la muestra de suelo se incubó con la cal durante 30 días y se mantuvo entre el 50 y 60% de su máxima capacidad de retención de humedad. Luego, la muestra de suelo se esterilizó en autoclave (120 °C a 1,2 kg cm² en dos ciclos de una hora) y se dejó secar al aire durante siete días. Posteriormente, la muestra del suelo se transfirió a vasos plásticos a razón de 400 g de suelo (base seca). Los vasos se perforaron en la base para permitir el riego.

El suelo de los potes recibió P a razón de 0, 75, 150, 300 y 600 mg kg⁻¹, como fuente de P se utilizó RP no acidulada (12,2% P) la cual fue previamente tamizada a 500 µm. Así mismo, se adicionó inóculo micorrizal crudo de *Glomus fasciculatum* a razón de 20 g/vaso. El inóculo contenía 25 esporas g⁻¹, micelio extraradical y fragmentos de raíces con un 90% de colonización micorrizal; a través del protocolo desarrollado por Porter (1979) se detectó que el inóculo tenía 40 propágulos infectivos g⁻¹. En ambos casos la RP y el inóculo se mezclaron uniformemente con el suelo de cada vaso. Los vasos sin inóculo micorrizal recibieron la misma cantidad del inóculo previamente esterilizado en autoclave (1 h).

Semillas de *Leucaena leucocephala* fueron escarificadas en H₂SO₄ concentrado durante 30 minutos, luego enjuagadas con abundante agua (Habte & Manjunath 1987) y dispuestas por 48 h en cajas de Petri con papel toalla húmedo estéril para su germinación. Cuatro semillas germinadas se sembraron (Marzo 21, 2009) en cada vaso, cuatro días después de la siembra se eliminaron tres plántulas y se dejó una sola por vaso. En ese momento el suelo se inoculó, alrededor de la plántula, con 10 mL de la suspensión de *Mortierella* sp. (7x10⁹ UFC mL⁻¹) descrita anteriormente. Los vasos no-inoculados recibieron la misma cantidad del inóculo previamente esterilizado en autoclave (0,5 h).

Los vasos se mantuvieron durante 75 días después de la siembra en la casa de malla del Laboratorio de Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, bajo luz natural. El suelo se humedeció regularmente con agua corriente para mantenerlo entre 50 y 60 % de su máxima capacidad de retención de humedad. Semanalmente los vasos recibieron 20 mL de la solución nutritiva de Hoagland libre de P (Habte & Osorio 2001).

El contenido de P se monitoreó en el cuarto pínulo de la hoja más joven completamente desarrollada (Habte *et al.* 1987; Habte & Osorio 2001) a los 17, 30, 45, 60 y 75 días después de la siembra. Los pínulos muestreados fueron secados a 60°C por 24 horas y se determinó su masa seca. Luego se transfirieron a tubos de ensayo y se llevaron a una mufla para obtener sus cenizas a 500 °C durante 6 horas. Posteriormente, estas fueron suspendidas en 1 mL de HCl 1 M y se adicionaron 9 mL de agua destilada (Osorio 2008). La concentración de P se hizo por el método de azul-molibdato (Murphy & Riley 1962).

En Junio 3 de 2009, las plántulas se cosecharon y se determinó la biomasa seca aérea (36 horas a 60°C). El contenido de P total absorbido ($\mu\text{g/planta}$) se estimó a través de la biomasa aérea seca (g) al momento de la cosecha y el nivel de P foliar, tal como lo sugiere Habte *et al.* (1987). El pH del suelo rizosférico (suelo que quedó adherido a las raíces luego de su remoción) se midió con un potenciómetro, para esto se empleó una proporción masa: volumen 1:2, en agua. Así mismo, se determinó la concentración de P soluble en el suelo mediante el método de Brown ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M).

Se verificó la colonización micorrizal en raíces finas tomadas aleatoriamente. Para esto las raíces se aclararon con KOH al 10% (Phillips & Hayman 1970) durante 24 horas a temperatura ambiente, se enjuagaron con abundante agua y se acidificaron con HCl al 10% durante 5 minutos. Posteriormente, las raíces se tiñeron con fuschina ácida al 0,15% (Brundrett *et al.* 1996) durante 48 horas; el exceso de colorante se removió con una solución de lacto-glicerol (63 mL de glicerina, 63 mL de agua y 874 mL de ácido láctico) durante 24 horas. Las raíces fueron almacenadas en glicerina acidificada hasta su evaluación al estereomicroscopio. La colonización micorrizal se determinó a través del método de intersección de la cuadrícula (Giovannetti & Mosse 1990).

La presencia de *Mortierella* sp. se determinó en las raíces de cada planta, para lo cual, se tomaron 20 fragmentos aleatoriamente de raíces frescas finas de 1 cm de longitud sin lavar. Estas raíces se transfirieron a cajas de Petri que contenían medio YMA (KH_2PO_4 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; NaCl 0,1 g; manitol 10 g; extracto de levadura 1 g; agar 15 g L^{-1} ; ajustado a pH 6) con sulfato de estreptomina (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ciclohexamida (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y benomil (75 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Los antibióticos se prepararon en agua destilada estéril, se esterilizaron por microfiltración (membrana de nitrocelulosa con poro de 0,22 μm) y se adicionaron separadamente sobre la superficie del medio en las cajas de Petri. Las muestras fueron incubadas a 32°C por 36 horas (Osorio 2008).

Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (5 x 2 x 2). Los tratamientos consistieron en la combinación de los cinco niveles de P (0, 75, 150, 300, 600 mg P kg^{-1} de suelo) empleando como fuente RP, dos niveles de inoculación con el hongo micorrizal *G. fasciculatum* (inoculado: HM+, no-inoculado HM-) y dos niveles de inoculación con *Mortierella* sp. (inoculado: MSP+, no-inoculado MSP-). Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones.

El contenido de P foliar en el cuarto pínulo se transformó con Exp (x) para el día 17, en los días 45 y 60 se transformó con Ln (x), con el objeto de cumplir con la normalidad ($P \geq 0,05$) y la homocedasticidad ($P \geq 0,05$), evaluadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Brown & Forsythe's respectivamente. El contenido de P foliar en el día 30 no fue necesario transformarlo, ya que cumple con los supuestos. De igual manera, las variables P total absorbido ($\mu\text{g/planta}$), biomasa aérea (g) y pH del suelo rizosférico fueron transformados con Ln (x), la evaluación de los supuestos se hizo con las mismas pruebas (Tabla 5).

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (prueba F) (Tabla 6) y a separación de medias con la prueba LSD. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia ($P \leq 0,05$). El contenido de P en el día 75 se analizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, puesto que esta variable no cumplió con el supuesto

de normalidad. La separación de los rangos medios se hizo utilizando la prueba descrita por Dunn (1967) (Sheskin 2000). Para los análisis estadísticos se usó el software SAS versión 9.1.3.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1. Sorción y desorción microbial de P

La capacidad de fijación de P (en mg kg^{-1}) en el suelo esta en función de la concentración de P en la solución del suelo (en mg L^{-1}). A medida que se aumenta la concentración de P en la solución del suelo, este es adsorbido describiendo una curva logarítmica (Figura 1, Anexo 1). De acuerdo con el modelo linearizado de Lagnmuir, este suelo presenta una máxima capacidad de fijación (k) de $1081 \text{ mg P kg}^{-1}$ y una constante de afinidad (b) de 0,7 (Anexo 2).

Al realizar la desorción de P, se encontró que no existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en la concentración de P en solución (producto de la desorción) al inocular (MSP+) o no (MSP-) con el hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. (Figura 2, Anexo 3).

4.2 Experimento 2. Efecto de niveles crecientes de RP sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*.

4.2.1 Concentración P en solución (mg L^{-1})

Al aumentar la cantidad de RP en el medio de cultivo inoculado con *Mortierella* sp. se observó un aumento en la concentración del P en el medio. La concentración de P soluble aumentó desde $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ (nivel más bajo de RP: $0,5 \text{ g L}^{-1}$) hasta $62,0 \text{ mg L}^{-1}$ máximo valor detectado con 2 g RP L^{-1} . Cantidades de RP iguales o por encima de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ no aumentaron significativamente la concentración de P soluble obtenida a $2,0 \text{ g RP L}^{-1}$, estos valores fluctuaron entre $46,0$ - $54,8 \text{ mg P L}^{-1}$ (Figura 3, Anexo 4).

4.2.2 pH final del medio

El pH inicial del medio de cultivo fue 7,3, después del periodo de incubación el pH disminuyó notoriamente a un rango entre 2,2-3,1. Con las dosis de RP adicionada de $0,5$ y $1,0 \text{ g L}^{-1}$, el pH final fue significativamente más bajo con valores de 2,2 y 2,5, respectivamente. Con la adición de RP entre $1,5$ y $3,5 \text{ g L}^{-1}$ el pH final del medio no fue significativamente diferente, éste fluctuó 2,9 a 3,1 (Figura 4, Anexo 5).

4.2.3 Producción de biomasa fúngica (g)

Se encontró que la producción de biomasa fúngica (g) esta en función de la dosis de RP adicionada al medio de cultivo. Esta variable describe una típica curva de crecimiento sigmoideal, de tal manera que se detectan condiciones limitantes y suficientes de RP en el medio (Figura 5). La mayor producción de biomasa se obtuvo con las dosis de $3,0$ y $3,5 \text{ g RP L}^{-1}$ ($0,36$ y $0,37 \text{ g}$, respectivamente), las cuales fueron significativamente superiores a las obtenidas con las otras dosis de RP; las dosis de RP de $0,5$ a $2,5 \text{ g L}^{-1}$ produjeron entre $0,20$ a $0,29 \text{ g}$ de biomasa fúngica (Anexo 6).

4.3 Experimento 3. Efecto de niveles crecientes de glucosa sobre la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in vitro*.

4.3.1 Concentración P en solución (mg L^{-1})

Se presentó un incremento significativo en la concentración de P en solución conforme la dosis de glucosa aumentó desde $2,5$, $5,0$ a $7,5 \text{ g L}^{-1}$, los valores de P en solución fueron $17,1$, $42,7$ y $50,8 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. La concentración media de P en el medio no aumentó significativamente de lo obtenido con el nivel de glucosa de $7,5 \text{ g L}^{-1}$, los valores fluctuaron desde $50,8$ a $52,3 \text{ mg de P L}^{-1}$ (Figura 6, Anexo 7)

4.3.2 pH final del medio

El pH inicial del medio fue de 7,4, luego de la inoculación e incubación se detectó una disminución muy fuerte de pH que fluctuó entre 2,7 y 5,9 (Figura 7). Al aumentar la dosis de glucosa el pH fue disminuyendo significativamente en las dosis más baja de glucosa (Anexo 8). Niveles de glucosa por encima de 10 g L^{-1} ($12,5$ a 25 g L^{-1}) no disminuyeron significativamente el pH por debajo de lo ya obtenido con la dosis de glucosa de 10 g L^{-1} , cuando se evalúan los rangos medios en cada uno de los tratamientos con la prueba de Dunn.

4.3.3 Producción de biomasa fúngica (g)

Se encontró que la producción de biomasa en *Mortierella* (g) está en función lineal con la dosis de glucosa en el medio de cultivo dentro del rango estudiado (Figura 8). La mayor producción de biomasa se obtuvo con la dosis de 25 g L^{-1} (0,48 g) y la mínima con la dosis de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (0,12 g). El modelo de regresión [Biomasa (g) = $0,10093 + 0,01605 \times (\text{glucosa } \text{g L}^{-1})$] indica que al aumentar en una unidad el nivel de glucosa se aumenta la biomasa en 0,016 g la biomasa seca del hongo *Mortierella* sp. (Anexo 9).

4.4 Experimento 4. Efecto de la doble inoculación con un hongo micorrizal y un hongo solubilizador de P sobre la absorción de P y el crecimiento de leucaena en casa de malla.

Los análisis de varianza realizados arrojaron diferentes niveles de significancia que son resumidos en la Tabla 6.

4.4.1 Contenido de P foliar

Los resultados indican que el contenido de P foliar estuvo afectado por los tratamientos y su efecto fue variable a través del tiempo (Tabla 6, Figura 9). En general, las plantas que crecieron en el suelo no-inoculado (control) presentaron contenidos de P foliar más bajos y, a través del tiempo el valor disminuyó hasta alcanzar en el día de la cosecha un valor de $0,63 \mu\text{g P/pínulo}$. Las plantas exhibieron típicos síntomas de deficiencia de P como caída prematura de hojas, reducción en el tamaño de los pínulos, enanismo y pobre desarrollo del sistema de raíces, sin importar la adición de P vía RP. Las plantas que crecieron en el suelo inoculado solamente con *Mortierella* sp. (MSP) exhibieron una tendencia similar al descrito para el control. De hecho, no se presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos en todos los tiempos de muestreo. Al momento de la cosecha, el contenido de P foliar de las plantas que crecieron en el suelo inoculado únicamente con el MSP fue $0,60 \mu\text{g P/pínulo}$. Estas plantas también exhibieron síntomas de deficiencia de P independiente del nivel de P aplicado con la RP.

En contraste, el contenido de P foliar de las plantas que crecieron en el suelo inoculado con *G. fasciculatum* fue significativamente mayor que el control en todos los días de muestreo; esto fue detectado muy tempranamente (día 30) (Figura 9; Anexo 11). A partir de éste día el contenido de P foliar creció progresivamente hasta alcanzar un pico de $5,45 \mu\text{g P/pínulo}$ en el día 45 (Anexo 12), para luego disminuir y alcanzar un valor de $3,90 \mu\text{g P/pínulo}$. Las plantas no desarrollaron síntomas de deficiencia de P y mostraron un buen crecimiento.

Con la doble inoculación (HM & MSP), el contenido de P foliar siguió la misma tendencia que la obtenida con la inoculación con el HM (Figura 9); sin embargo, el pico del máximo contenido de P foliar fue de $5,73 \mu\text{g P/pínulo}$ y se alcanzó en el día 60. Al momento de la cosecha, el contenido de P foliar de las plantas que crecieron en el suelo con ambos inóculos exhibieron un valor de $5,08 \mu\text{g P/pínulo}$.

Los análisis estadísticos indican que hubo una interacción significativa entre los factores HMxMSP en los días 30 y 60 (Tabla 6, Anexos 11 y 13). El nivel de inoculación en donde estuvo presente el HM favoreció el incremento en el contenido de P en el día 30, así, las plantas del suelo inoculado solamente con el HM presentaron un contenido de $2,63 \mu\text{g P/pínulo}$ significativamente mayor que la doble inoculación (HM &

MSP) con 1,96 $\mu\text{g P/pínulo}$, estos dos niveles de inoculación difieren del control y del inoculado únicamente con el MSP, que presentaron 1,53 $\mu\text{g P/pínulo}$, sin diferencias significativas entre estos dos (Figura 10 b). En el día 60, la doble inoculación favoreció el aumento en el contenido de P foliar (5,7 $\mu\text{g P/pínulo}$) significativamente por encima de los demás niveles de inoculación [control, MSP y HM (4,6 $\mu\text{g P/pínulo}$)]. Las plantas del tratamiento control y el inoculado con el MSP exhibieron una respuesta similar, sus contenidos de P fueron 0,89 y 0,84 $\mu\text{g P/pínulo}$, respectivamente (Figura 10c). Nótese que en ambos casos el contenido de P foliar no cambió significativamente en ausencia de *G. fasciculatum*.

La interacción HMxRP también resultó significativa en el día 30, el incremento en el contenido de P foliar con la inoculación de *G. fasciculatum* dependió del nivel de P aplicado vía RP. Esto es, en ausencia de RP (suelo no fertilizado) la inoculación no incrementó el nivel de P foliar pero sí cuando se aplicó RP; sin embargo, el efecto fue mayor con la adición de 150 mg P kg^{-1} y menor con el nivel más alto de aplicación (600 mg P kg^{-1}) (Figura 10a).

4.4.2 P total absorbido

Los resultados indican que el P total absorbido en la parte aérea de las plantas de *L. leucocephala* al momento de la cosecha (día 75) no presentó interacciones significativas (Tabla 6, Anexo 19), el P total absorbido estuvo en función de los efectos principales (figura 13), se encontró respuesta positiva de forma global a las inoculaciones, la dosis de RP que optimiza el P total absorbido es 150 mg P kg^{-1} .

4.4.3 Biomasa aérea seca

Los resultados indican que la biomasa seca de las plantas de leucaena al momento de la cosecha dependió de la interacción entre HMxMSP (Tabla 6, Anexo 15). Las plantas control (no-inoculadas) exhibieron un pobre crecimiento y acumularon una biomasa muy baja (0,31 g) al día 75. Las plantas inoculadas solamente con *Mortierella* sp. también exhibieron un pobre crecimiento (0,33 g) y su biomasa no fue diferente de aquellas del tratamiento control (Figura 11). Por el contrario, las plantas que crecieron en el suelo inoculado solamente con *G. fasciculatum* exhibieron un buen desarrollo y su biomasa (1,95 g) fue significativamente superior que aquellas no-inoculadas. La doble inoculación (*G. fasciculatum* + *Mortierella* sp.) favoreció significativamente la acumulación de biomasa aérea por encima de aquella obtenida con sólo la inoculación micorrizal (HM) obteniéndose un valor de 2,56 g (Figura 11).

4.4.4 pH del suelo al final del ensayo

El pH final del suelo rizosférico fue afectado significativamente por la interacción entre la inoculación micorrizal (HM) y la inoculación con el MSP (Tabla 6, Anexo 16). Independiente del nivel de P aplicado, el control (no-inoculado) presentó un pH final de 5,7; al inocular con *Mortierella* sp. el pH final fue significativamente mayor que aquel del control y tuvo un valor de 5,9 (Figura 12a). La inoculación con *G. fasciculatum* sola o acompañada de *Mortierella* sp. provocó una reducción del pH final con respecto a aquel del control, los valores obtenidos fueron 5,4 y 5,3, respectivamente, los cuales no difieren significativamente (Figura 12a).

Así mismo, el pH final fue afectado significativamente por la interacción HMxRP (Tabla 6, Anexo 16). El pH final del suelo rizosférico con la inoculación micorrizal (HM+) estuvo por debajo del pH obtenido en ausencia de la inoculación (HM-) en todos los niveles de P aplicado como RP (Figura 12b) (incluyendo el suelo no fertilizado con RP, 0 mg P kg^{-1}). La diferencia en el valor de pH entre la condición micorrizal y no-micorrizal disminuyó conforme el nivel de RP aumentó (Figura 13b).

4.4.5 Colonización de *Mortierella* sp.

La colonización de *Mortierella* sp. en las raíces de leucaena sólo se detectó en aquellas plantas que crecieron en suelo inoculado. La colonización de este hongo solubilizador de P en promedio fue de 81% (Anexo 18).

4.4.6 Colonización *G. fasciculatum*

No se detectó colonización micorrizal de las plantas que crecieron en el suelo no inoculado. Al inocular sólo *G. fasciculatum* el valor medio de la colonización fue del 43%, mientras que al inocular conjuntamente *G. fasciculatum* y *Mortierella* sp. se encontró un valor de colonización micorrizal de 55,5%, (Anexo 17).

5 DISCUSIÓN

Los resultados en esta investigación muestran que la doble inoculación del suelo con *G. fasciculatum* y *Mortierella* sp. permitieron una mayor absorción de P y crecimiento de *L. leucocephala* independiente del nivel de P aplicado (Figuras 9 y 11). El hongo micorrizal por sí sólo fue capaz de mejorar el contenido de P foliar y la biomasa aérea de leucaena. En contraste, el hongo solubilizador por sí sólo fue incapaz de mejorar el desempeño de leucaena en estas dos variables.

La concentración de P en la solución de suelo fue baja (0,033 mg P L⁻¹ y 11 mg kg⁻¹ por los métodos de CaCl₂·2H₂O 0,01 M y Bray II respectivamente) y las raíces de leucaena al parecer no fueron capaces de absorberlo. La sola inoculación con *Mortierella* sp. no incrementó la concentración de P disponible en el suelo. Esta incapacidad de este hongo para incrementar el P de la solución del suelo pudo deberse a que las plantas del tratamiento MSP exhibieron síntomas de deficiencia de P, pobre crecimiento, limitada fotosíntesis y, por ende, no suministraron suficiente carbono (vía rizodeposición) requerida para la producción de ácidos orgánicos. El experimento 3 muestra claramente que la capacidad para disolver RP esta en función de la cantidad de carbono suministrada a *Mortierella* sp. para producir una disminución significativa en el pH del medio. Otro factor que limita la efectividad de éste hongo para aumentar la concentración de P disponible en el suelo es la capacidad del suelo para fijar Pi (experimento 1). En un Mollisol, la inoculación de sólo *Mortierella* sp. al suelo fue capaz de mejorar la absorción de P en leucaena libre de micorriza, en este caso, esto fue debido a la baja capacidad de fijación de Pi (Osorio 2008). En el caso de que la inoculación con sólo *Mortierella* sp. haya disuelto RP, estos iones Pi pudieron ser sorbidos en las superficies minerales del suelo o ser precipitados con iones de Al³⁺ y Fe³⁺ (Guppy *et al.* 2005; Mathews *et al.* 1998). En realidad no se tienen evidencias de que haya ocurrido tal disolución, sin embargo, el hecho de que el pH final del suelo haya incrementado de 5,3 a 5,9 sugiere que hubo consumo de H⁺ en el suelo rizosférico, lo cual es compatible con la liberación de CO₃²⁻ y PO₄³⁻ por la RP. En este caso a pesar de una posible disolución de RP no hubo efecto sobre el desempeño de la planta.

Por otro lado, la inoculación con *G. fasciculatum* mejoró el desempeño de la planta significativamente. Es bien sabido que leucaena es altamente dependiente de la asociación micorrizal, particularmente cuando el P disponible del suelo no es capaz de satisfacer los requerimientos de la planta (Habte & Manjunath 1991). El desarrollo de la asociación micorrizal permite tener un sistema de absorción de Pi más eficiente debido a la presencia de hifas del hongo micorrizal (Barea *et al.* 2008). Estas son capaces de explorar un mayor volumen de suelo (Grace *et al.* 2009; Ferrol & Pérez-Tienda 2009) y absorber el Pi a una concentración más baja que lo que puede tomar la raíz de leucaena (Barber 1995; Bolan 1991).

En este estudio se ha detectado que en la rizósfera de leucaena micorrizada el pH es significativamente menor (0,5-0,6 unidades de pH) que en leucaena no-micorrizada (Figura 12) (Whitehead 2008). Tales efectos sobre el pH del suelo inducido por la hifas micorrizales los reporta Peterson *et al.* (2004). Quizá esta disminución en el pH inducida por la asociación micorrizal contribuya a disolver RP o fosfato de Ca nativo insoluble, y, en consecuencia, mejorar la absorción de P y el crecimiento vegetal (Figuras 9, 10c, 11). Este resultado es bastante interesante porque sugiere que al disminuir el pH de la rizósfera se puede fomentar la disolución de compuestos fosfatados insolubles, algo que ha sido rechazado (Bolan 1991).

Al observar la interacción HMxRP se puede considerar que *G. fasciculatum* pudo disolver RP, esto puede afirmarse ya que el pH de la rizósfera fue menor en las plantas micorrizadas (Figura 12), concomitante se observó un mayor contenido de P foliar (Figura 10) y más biomasa (Figura 11). El efecto del pH es mayor con el incremento de la dosis de RP (y por encima del no fertilizado) (Figura 12b), a pesar de su baja solubilidad (Shaviv 2001; Khasawneh & Doll 1979), lo cual lleva a pensar que la micorriza ayudo activamente en el proceso de disolución (Bolan 1991).

La doble inoculación (HM & MSP) aumentó la absorción de P y el crecimiento de leucaena. Es muy posible que las raíces micorrizadas hayan favorecido el aumento de la rizodeposición de carbón en la rizósfera (o micorrizosfera) (Sharma & Johri 2002). En consecuencia, se pudo haber estimulado una mayor producción de acidez (Figura 12a), tal como lo sugieren los resultados *in vitro* del experimento 3. Tuner *et al.* (2006)

mencionan que numerosos microorganismos del suelo pueden adquirir P eficientemente independiente de la disponibilidad de otros nutrientes solubilizando minerales primarios de fosfato en suelos tropicales. Estos investigadores también mencionan que en suelos del trópico existen bacterias con la habilidad para solubilizar P de óxidos de Fe. Una mayor cantidad de compuestos carbonaceos (proveniente de la rizodeposición micorrizal) para *Mortierella* sp. permite una mayor disolución de RP y fosfato de Ca nativo. La disolución de P inducida por el MSP pudo en este caso ser efectiva para mejorar el desempeño de la planta gracias a la red hifal que es muy eficiente en la toma de P. De esta forma, la efectividad de MSP en este suelo sólo se manifiesta en raíces micorrizadas y no en ausencia del HM. Este efecto sinérgico de ambos hongos sobre el desempeño de leucaena ha sido reportado por Osorio (2008) en un Mollisol y en dos Oxisoles comparables al suelo del presente estudio.

Los resultados indican que al inocular con el MSP se retrasó el pico de máximo contenido foliar de P. Se advierte que el pico para las plantas solo inoculadas con *G. fasciculatum* ocurrió en el día 45, mientras que al inocular con ambos hongos el pico ocurrió en el día 60 (Figura 9). Los beneficios de la doble inoculación sobre el contenido foliar de P son evidentes a partir del día 53 (aproximadamente). Especulando un poco, es posible que esto se deba a que existe una competencia entre ambos hongos para establecerse en la raíz; quizá *Mortierella* sp. colonizó primero la raíz que *G. fasciculatum*. Webster & Weber (2007) y Alexopoulos *et al.* (1996) reportan que hongos del género *Mortierella* son activos saprofitos en el suelo. Reddy & Reddy (2005) los califican como hongos celulolíticos. En observaciones de laboratorio complementarias a esta investigación sugieren que estos hongos pueden usar un amplio rango de fuentes de carbono (glucosa, manitol, dextrosa, almidón, exudados de la raíz, celulosa) ya que han crecido satisfactoriamente en diversos medios de cultivos (YMA, PDA, extracto de malta, medio V8 agarizado). También se ha detectado que bajo condiciones *in vitro* es muy invasivo y altamente competitivo, además tolera antibióticos (ciclohexamida, benomyl, estreptomycin). Estos puntos hacen pensar que *Mortierella* sp. tiene una alta habilidad competitiva para establecerse en la rizósfera (rizoplano) de leucaena y así competir con *G. fasciculatum*. Al considerar la Figura 10, en el día 30 los efectos de *G. fasciculatum* sobre el contenido de P foliar, si bien son significativos, son de una magnitud pequeña. En contraste, 30 días después (día 60) los efectos de éste hongo micorrizal son sobresalientes. Es lógico pensar que en el primer caso, el hongo micorrizal no se había establecido completamente (debido quizá a la competencia con *Mortierella* sp.), pero en el segundo caso, cuando la asociación micorrizal ya esta formada, si se pueden observar los beneficios en la captación y translocación de P hacia la planta hospedera. Esta segunda fecha (día 60) coincide con el momento en el cual se alcanza el pico de máxima contenido foliar de P en los pínulos de leucaena (5,73 µg P/pínulo), el cual fue superior al obtenido sólo con el hongo micorrizal (5,45 µg P/pínulo) (Figura 9). La competencia entre *Mortierella* sp. y *G. fistulosum* se ha reportado por Osorio (2008). Así mismo, el valor de colonización micorrizal disminuye al inocular el suelo con *Mortierella* sp. en presencia de las dosis de 75 y 150 mg kg⁻¹. Sin embargo, esta aparente competencia no afectó el desempeño de las plantas y los efectos de ambos con la co-inoculación fueron sinérgicos, como se mencionó anteriormente. Adicionalmente, los gránulos de RP se dispersaron en el volumen del suelo, esto hace que sea necesario esperar un tiempo dado, para que *Mortierella* sp. entre en contacto con ellos, los disuelva y permita que *G. fasciculatum* absorba los iones Pi y los transfiera a la planta. Investigaciones del CIAT (1982) en este mismo suelo indican que la efectividad agronómica relativa de la RP aplicada al voleo e incorporada (dispersa) es muy baja. Por otro lado, no se debe descartar la posibilidad de que *G. fasciculatum* sea capaz de disolver la RP y fosfato de calcio nativo, ya que con su presencia se disminuye el pH de la rizósfera. Sin embargo, tal disminución del pH debe atribuirse a la combinación de raíz y HM. Si este hongo micorrizal disuelve directamente RP, es algo que debería ser estudiado con más detalle.

En el día 30 con la interacción HMxRP detectada en el P foliar, sugiere que no se requiere aplicar dosis muy altas de RP ya que estas dosis reducen la magnitud del efecto benéfico. Se sospecha que esto se debe a que al disolver la RP se genera un buffer en el pH y la disminución en el pH se amortigua. La reducción en el pH es clave en el proceso de disolución. Al disolver la RP (Ca_{0,69}Na_{0,22}Mg_{0,09}(PO₄)_{5,14}(CO₃)_{0,86}F_{2,34}, según Chien & Hammond 1978) se liberan CO₃²⁻ y PO₄³⁻, al rango de pH de suelo observado (5,3-5,9) ambos aniones consumirán H⁺ de la solución de suelo (Rajan *et al.* 1996), lo cual contrarresta el efecto acidificador de ambos hongos como puede detectarse en la Figura 12a y muy particularmente en la Figura 12b con el incremento de la RP. De igual forma, los resultados del experimento *in vitro* No. 2 indican que en la medida que aumento el nivel de RP en el medio de cultivo la reducción del pH no fue tan grande. Se aprecia que el pH inicial fue de

7,3, luego de incubar el medio con *Mortierella* sp. el pH final con 0,5 g de RP L⁻¹ fue de 2,2, mientras que con la dosis más alta de RP (3,5 g L⁻¹) el pH final fue de 3,1. Osorio (2008) encontró que las dosis altas de RP redujeron los efectos benéficos de la coinoculación con un HM y *Mortierella* sp., al parecer por disminuir la disponibilidad de Cu y Zn para las plantas.

En el experimento No. 1 no se encontró evidencia para probar la hipótesis que *Mortierella* sp. tiene la capacidad de desorber fósforo previamente adsorbido y con ello aumentar la concentración de P en la solución del suelo. Este resultado contrasta con lo reportado por Osorio (2008) quien encontró que *Mortierella* sp. desorbió Pi de varios suelos a través de la producción de ácido oxálico. Es bien sabido que los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular pueden ayudar a la desorción de Pi en el suelo (Shane & Lambers 2005). En este estudio, éste ácido disminuyó el pH y disolvió la RP en los ensayos *in vitro*, pero al parecer no fue suficiente para desorber Pi.

Es claro que en este estudio se está evaluando el efecto de la aplicación directa de un MSP al suelo con el objetivo de que disuelva RP o P nativo del suelo, y que de esta manera aumente la concentración de P en solución para su posterior absorción por la raíz o por la micorriza. Sin embargo, los resultados de este estudio y otros complementarios, sugieren que *Mortierella* sp. podría emplearse para pretratar RP (bioacidulada) o para obtener otros fertilizantes fosfórico más solubles (tipo superfosfato, Ca(H₂PO₄)₂ ó CaHPO₄), tal como lo ha estudiado Bar-Yosef *et al.* (1999) con bacterias solubilizadoras de P. Para esto es necesario optimizar las condiciones del medio de cultivo. En primer lugar se debe considerar la fuente y dosis de carbono, los resultados del experimento No. 3 indican que con 7,5 g de glucosa por L es suficiente para obtener un nivel dado de P en solución, niveles por encima de éste, no aumentan el P soluble (Figura 6). En cuanto a las fuentes de carbono, ya se mencionó que este hongo puede utilizar glucosa, manitol, dextrosa, almidón, celulosa y exudados de la raíz. Así mismo, para maximizar la efectividad de éste hongo para solubilizar RP se encontró que es suficiente con adicionar 2,0 g de RP por L de medio. Dosis por encima de esta tienden a contrarrestar la disminución en el pH del medio por las razones mencionadas anteriormente y, en consecuencia, los niveles de P en solución son más bajos (Figura 3). En otros experimentos (Osorio 2008) se ha detectado que es preferible usar como fuente de N el NH₄⁺ que el NO₃⁻; así mismo, la inclusión de arcillas (p.e., caolinita, estimulan la disolución de RP).

Es claro que la capacidad de disolver biológicamente un mineral primario (apatita) en tan corto tiempo (siete días) abre la posibilidad de la bio-acidulación de rocas para hacer más disponible los nutrientes en el suelo y mejorar el crecimiento de las plantas. En este caso la capacidad del MSP dependió de la cantidad de RP L⁻¹ de medio, sugiriendo que dos gramos son suficientes para aumentar la concentración de P bajo condiciones *in vitro*; al respecto, Halder *et al.* (1990), trabajaron con dos gramos por litro cuando evaluaron la capacidad de bacterias fijadoras de nitrógeno para disolver diferentes tipos de RP. De otro lado, la fertilización fosfórica con RP mostró que en los días 30 y 60 las mejores dosis de P fueron 150 mg kg⁻¹ (Figura 10a). Estos resultados se asemejan a los encontrados en el experimento No. 2 y apoyan en parte la hipótesis que plantea que la capacidad de *Mortierella* sp. para disolver RP y aumentar la concentración de fósforo es una función de la dosis de RP adicionada (Figura 3, 10b).

Tabla 1. Concentración de las soluciones de trabajo y volúmenes requeridos para realizar la isoterma de adsorción de P en el Oxisol en el experimento No. 1

Nivel de P aplicado (mg kg ⁻¹)	Concentración de solución KH ₂ PO ₄ (mg P L ⁻¹)	mL de solución		mL volumen final
		KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.01 M	
0	0,0	0,0	30,0	30
50	0,1	1,5	28,5	30
83	0,1	2,5	27,5	30
100	0,1	3,0	27,0	30
183	0,1	5,5	24,5	30
250	0,1	7,5	22,5	30
383	0,1	11,5	18,5	30
500	0,1	15,0	15,0	30
633	1,0	1,9	28,1	30
833	1,0	2,5	27,5	30
900	1,0	2,7	27,3	30
1000	1,0	3,0	27,0	30

Tabla 2. Valores de significancia (*P*) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No.1, desorción microbial de P.

Ensayo	Variable	Normalidad	Homocedasticidad
Adsorción	P solución	0,0179	-----
Desorción biológica	Ln (P solución)	0,0609	0,2559

Tabla 3. Valores de significancia (*P*) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No. 2,

Ensayo	Variable	Normalidad	Homocedasticidad
Disolución de niveles crecientes RP	P solución	>0,150	0,2570
	pH medio cultivo	0,050	0,7734
	Biomasa fúngica (g)	>0,150	0,9138

Tabla 4. Valores de significancia (*P*) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No. 3

Ensayo	Variable	Normalidad	Homocedasticidad
Disolución de RP en presencia de niveles crecientes de glucosa	P solución	>0,150	0,5349
	pH medio cultivo *	-----	-----
	Biomasa fúngica (g)	0,085	0,5039

* Analizado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Tabla 5. Valores de significancia (*P*) correspondientes a la evaluación de los supuestos de normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre los residuales estudentizados y homocedasticidad con la prueba de Brown and Forsythe's en el experimento No. 4,

Ensayo	Variable	Normalidad	Homocedasticidad
Efecto de la doble inoculación con un HM y un MSP sobre la absorción de P y el crecimiento de leucaena	Exp (P µg/pinulo día 17)	>0,150	0,5604
	P µg/pinulo día 30	0,079	0,6891
	Ln (P µg/pinulo día 45)	>0,150	0,0549
	Ln (P µg/pinulo día 60)	>0,150	0,4605
	P µg/pinulo día 75 *	-----	-----
	Ln (biomasa aérea g)	0,119	0,4010
	Ln (pH suelo rizosférico)	0,065	0,1146
	Ln (P total absorbido µg/planta)	>0,150	0,1360

* Analizado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Tabla 6. Valores de significancia (*P*) correspondientes a las fuentes de variación para las variables de estudio del experimento No. 4.

Factor	Contenido de P foliar a través de tiempo (días) después de la siembra				P total absorbido	Biomasa seca	pH Suelo rizosférico
	17	30	45	60			
HM	NS	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MSP	NS	0,0024	0,0151	NS	0,0347	0,0008	NS
RP	NS	NS	NS	0,0481	0,0006	0,0271	0,0106
HMxMSP	NS	0,0020	NS	0,0154	NS	0,0057	0,0003
HMxRP	NS	0,0149	NS	NS	NS	NS	0,0035
RPxMSP	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RPxMSPxHM	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: No significativo

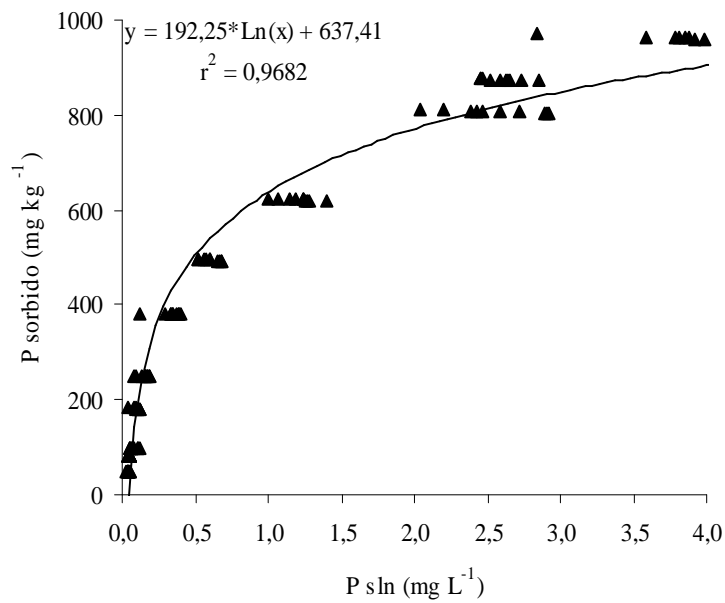


Figura 1. Isotherma de adsorción de P en un Oxisol de Santander de Quilichao (Cauca).

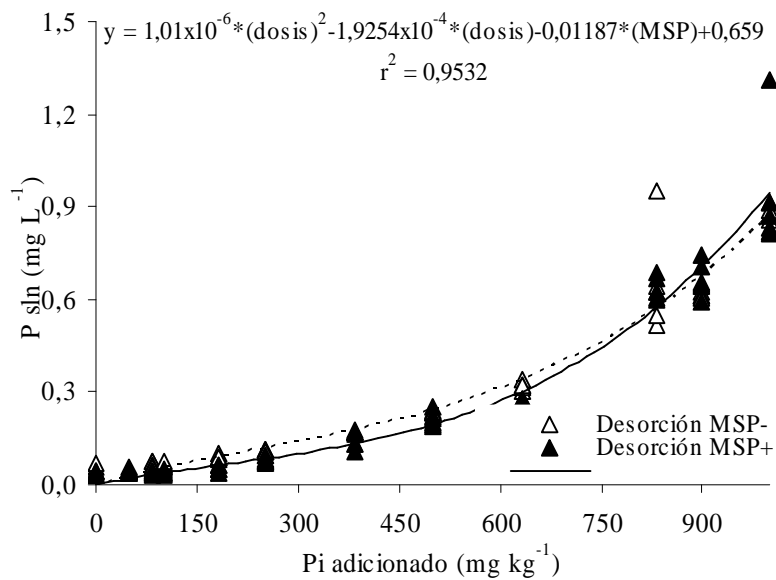


Figura 2. Desorción de P de un Oxisol de Santander de Quilichao (Cauca) con presencia (MSP+) y ausencia (MSP-) del hongo solubilizador de P *Mortierella* sp.

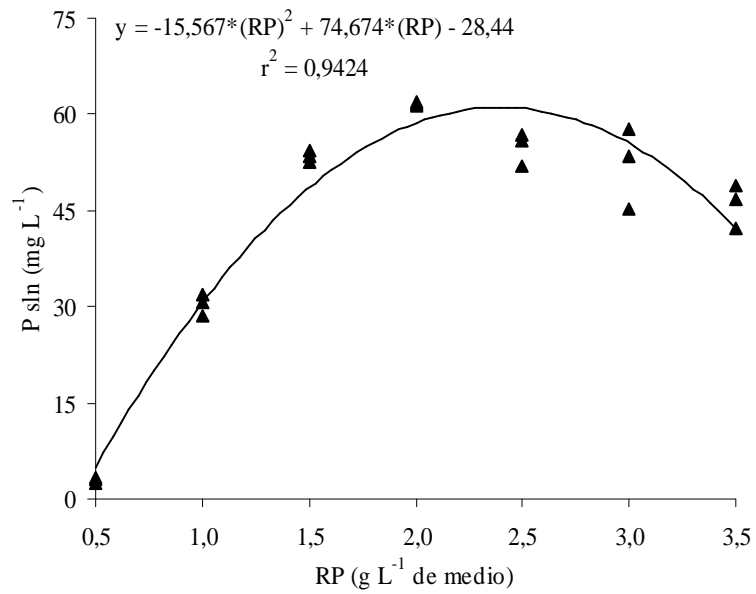


Figura 3. Concentração de P en el medio de cultivo en función de la cantidad de RP aplicada, inoculado con el hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. e incubado por 7 días

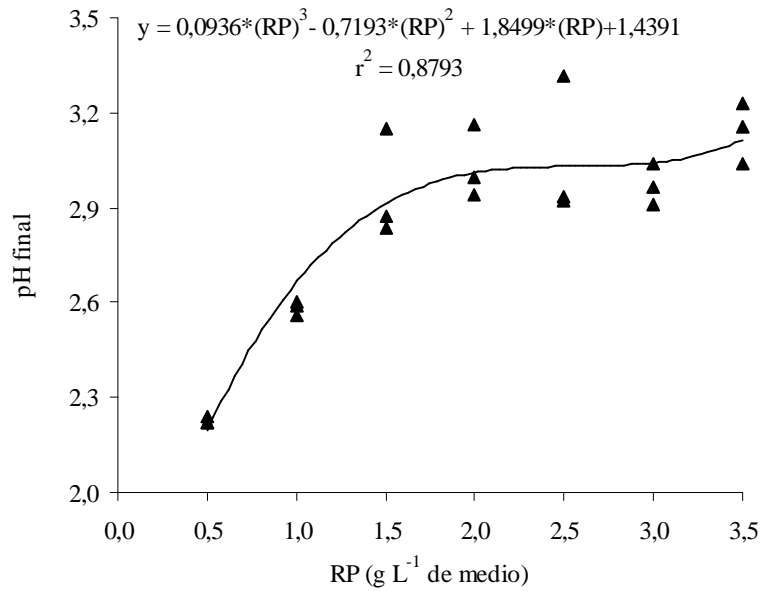


Figura 4. pH final del medio de cultivo en función de la cantidad de RP aplicada, inoculado con el hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. e incubado por 7 días.

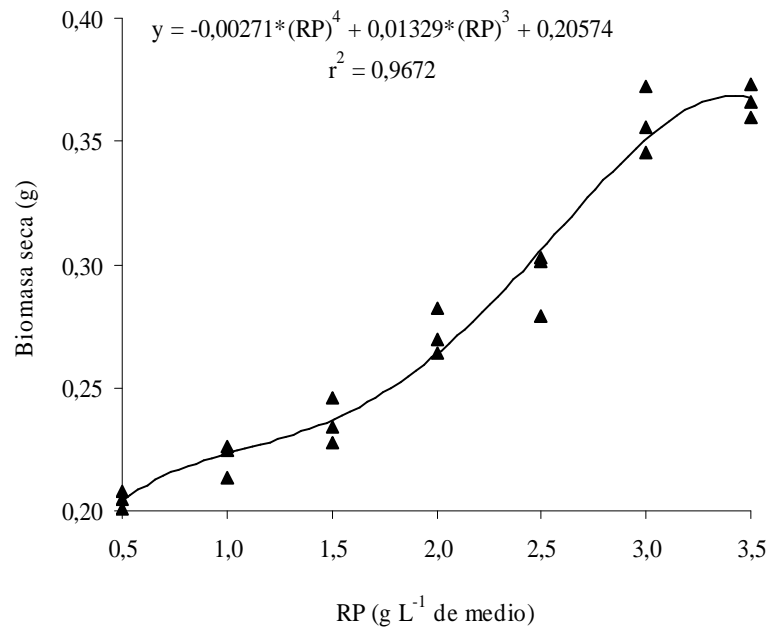


Figura 5. Biomasa del hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. en función de la cantidad de RP aplicada, incubado por 7 días.

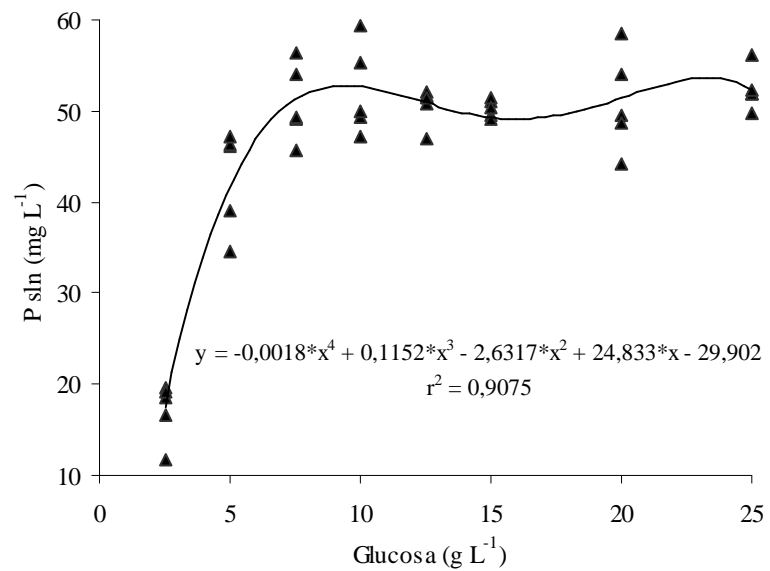


Figura 6. Concentración de P en el medio de cultivo inoculado con el hongo solubilizador de P *Mortierella* sp. en función de la cantidad de glucosa adicionada como fuente de carbono, incubado por 7 días.

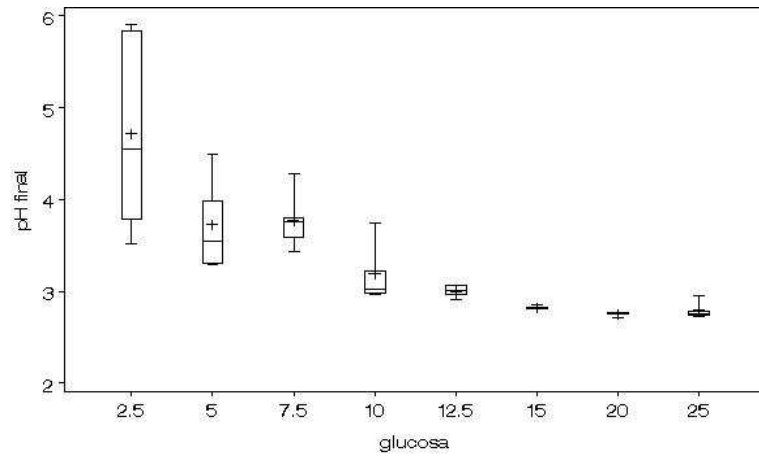


Figura 7. pH del medio de cultivo en función de la dosis de glucosa adicionada al medio de cultivo inoculado con el hongo solubilizador de *P. Mortierella* sp. e incubado por 7 días.

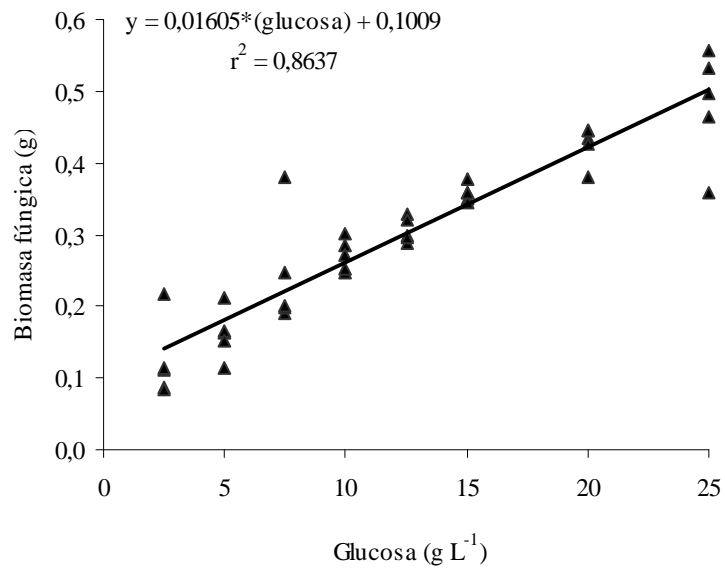


Figura 8. Biomasa del hongo solubilizador de *P. Mortierella* sp. en función de la dosis de glucosa adicionada al medio de cultivo, incubado por 7 días.

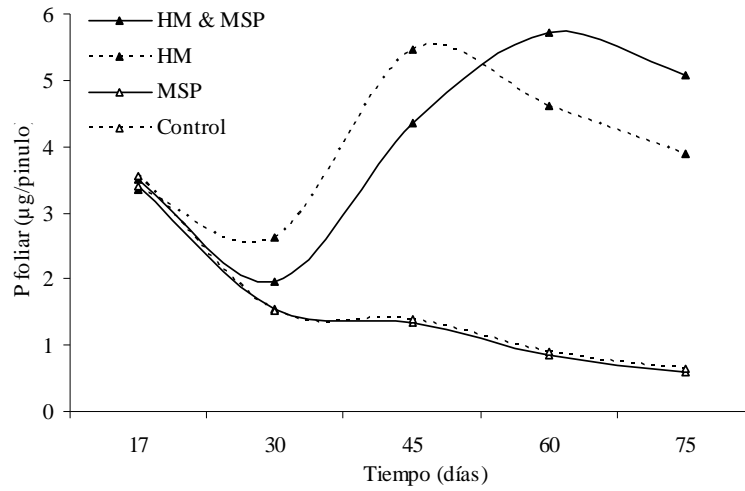
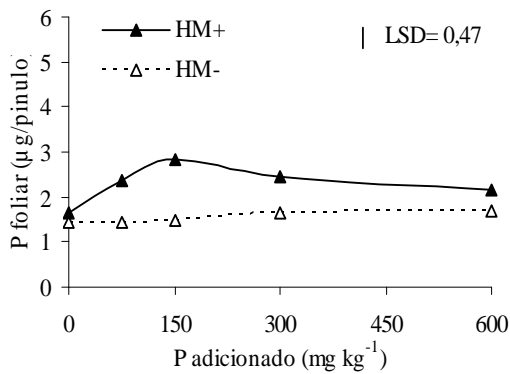
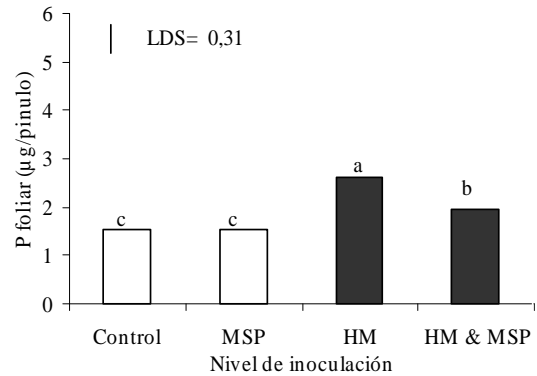


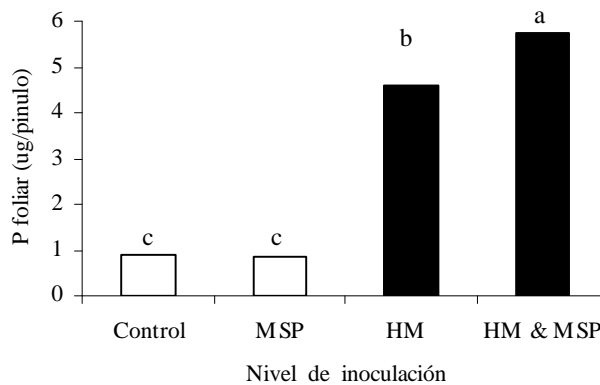
Figura 9. Contenido de P foliar ($\mu\text{g}/\text{pinulo}$) de *Leucaena leucocephala* a través del tiempo después del trasplante (17, 30, 45, 60, 75 días) en función de la inoculación con *Glomus fasciculatum* (HM) y *Mortierella* sp. (MSP).



(a) Interacción HM x RP día 30



(b) Interacción HM x MSP día 30



(c) Interacción HM x MSP día 60

Figura 10. Contenido de P foliar en los pínulos (μg) de *Leucaena leucocephala* en los días 30 y 60 (Anexos 11 y 13).

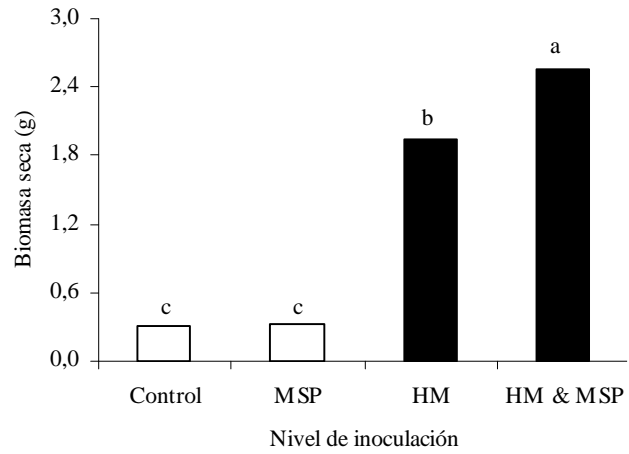
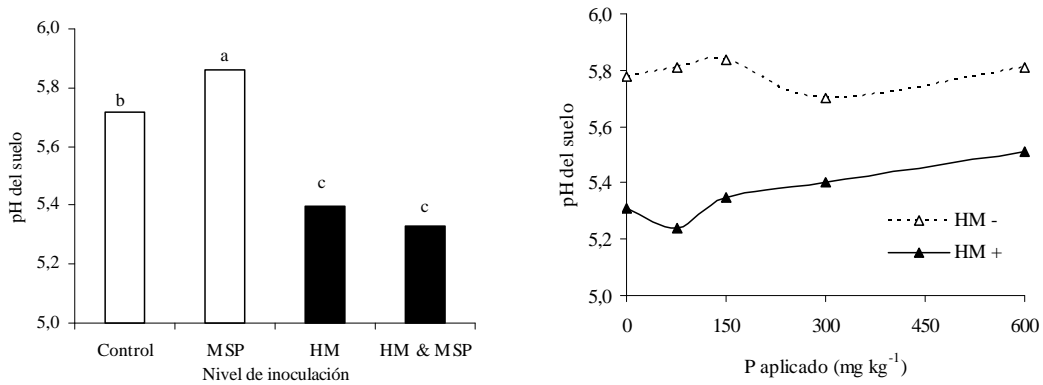
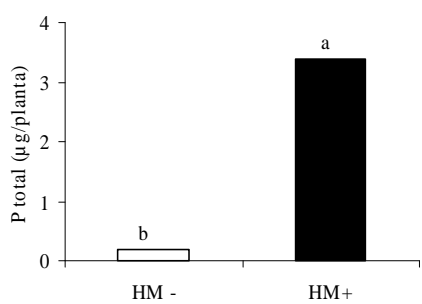


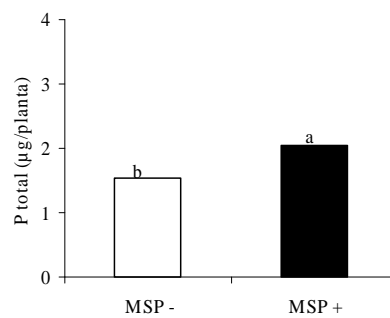
Figura 11. Biomasa aérea seca de *Leucaena leucocephala* en función de la interacción entre el hongo micorrizal y el hongo solubilizador de P (HMxMSP).



(a) Interacción HMxMSP (b) Interacción HMxRP
 Figura 12. pH del suelo rizosférico en función de la interacción entre el hongo micorrizal y el hongo solubilizador de P (HMxMSP, izquierda) y la interacción entre el hongo micorrizal y la aplicación de P vía RP (HMxRP) al momento de la cosecha.



(a) P total absorbido en función del HM



(a) P total absorbido en función del MSP

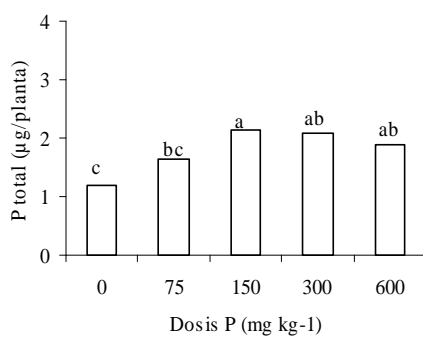


Figura 13. P total (µg/ planta) absorbido en función de los factores HM, MSP y RP.

6 CONCLUSIONES

No se encontró evidencia experimental que demuestre que *Mortierella* sp. desorbió fosfato previamente adsorbido en éste suelo, bajo las condiciones experimentales establecidas. Los efectos que se derivaron sobre la solubilización de P en este trabajo son atribuibles a la disolución de compuestos fosfatados y no a la desorción de P adsorbido en los coloides minerales del suelo, tal como se ha reportado en otros trabajos.

La capacidad del hongo *Mortierella* sp. para disolver RP dependió del nivel de RP en el medio *in-vitro*. Se encontró que una cantidad de 2,0 g L⁻¹ es suficiente para optimizar el nivel de P en solución producto de la disolución microbial de este material. Niveles de RP por encima de 2,0 g L⁻¹ amortiguaron la reducción del pH del medio y este estuvo alrededor de 3,0-3,1. Por el contrario, niveles de RP menores de 2,0 g L⁻¹ permitieron una mayor disminución en el pH y se alcanzaron valores de pH tan bajos como 2,2. Estos resultados se deben a la capacidad buffer generada por la presencia de iones carbonatos y fosfatos que resultan al disolverse la RP. El aumento en la dosis de RP en el medio también afectó significativamente la biomasa fúngica, esta fue mayor cuando los niveles de RP aumentaron.

La efectividad del hongo *Mortierella* sp. para disolver RP bajo condiciones *in-vitro* dependió del nivel de glucosa en el medio. Con el nivel más bajo de glucosa en el medio (2,5 g L⁻¹) el pH del medio sólo disminuyó a 4,7 y el nivel de P soluble fue significativamente más bajo (17 mg L⁻¹), bajo tales condiciones el mecanismo de disolución de RP fue limitado por la escasez del sustrato carbonaceo. Conforme el nivel de glucosa aumentó hasta 7,5 g L⁻¹, la disolución de RP fue más efectiva. Pero niveles superiores de glucosa no generaron aumento en la disolución de la RP. Por lo anterior, se recomienda el uso de glucosa a razón de 7,5 g L⁻¹.

El hongo *Mortierella* sp. por sí sólo fue incapaz de mejorar la absorción de P y el crecimiento de leucaena, en cambio el HM fue efectivo en esto. La doble inoculación del suelo con *G. fasciculatum* y *Mortierella* sp. aumentó la absorción de P y la masa seca de *Leucaena leucocephala* en este Oxisol. El efecto fue independiente de la aplicación de RP, es decir, se presentó tanto cuando se aplicaron los diferentes niveles de RP como cuando no se aplicó este material. Lo anterior sugiere que hubo tanto disolución de RP como de fosfatos nativos del suelo con la doble inoculación. Al inocular solamente con el hongo solubilizador de P, el pH de la rizosfera fue de 5,9, mientras que con la sola inoculación con *G. fasciculatum* se detectó un pH significativamente inferior (5,4) y con ambos hongos el pH rizosférico fue de 5,3. No existieron diferencias significativas entre estos dos últimos. Esto indica que el hongo micorrizal tuvo en efecto acidificante en la rizosfera (micorrizosfera) que podría ser responsable, al menos en parte, de disolver RP. Al momento de la cosecha fue posible detectar la presencia de los hongos que fueron inoculados, lo cual permite atribuir los efectos detectados a las inoculaciones respectivas.

7. RECOMENDACIONES

En observaciones adicionales en esta investigación, sugieren que en el aislamiento de MSP del suelo o la rizósfera se incluya verde bromocresol como indicador de pH (3,6-5,2, amarillo-azul). Cuando se prepara el medio de cultivo con RP el pH inicial en las cajas de Petri es de alrededor 7,3 y así el medio tiene un color azul oscuro. Luego de una incubación de tres días el pH puede descender por debajo de 3,5 (amarillo) y el medio se torna amarillo. Colonias de microorganismos capaces de realizar esta disminución del pH desarrollan un halo de color amarillo, y de esta manera es muy fácil detectarlas. Tres días pueden ser suficientes para realizar esta detección. Más allá de cuatro días el medio se vuelve de nuevo de color azul, ya que los ácidos orgánicos producidos pueden ser consumidos o ser neutralizados por CO_3^{2-} y PO_4^{3-} liberados en la disolución. Se estima que, es más conveniente emplear el verde bromocresol como indicador de pH que azul de bromotimol (rango de pH 6,0-7,6, amarillo-azul). La razón es que el rango de pH se acerca más a los valores de acidificación en los cuales la disolución es efectiva por los MSP en el medio de cultivo que el azul de bromotimol, con este último se podrían obtener falsos positivos y erróneamente seleccionar potenciales MSP.

8 REFERENCIAS

- Abd-Alla, M.H. 1994. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viceae* phosphatases. *Biology and Fertility of Soils*, 18:216-218.
- Abelson P.H. 1999. A potential phosphate crisis. *Science* 283: 2015–2015
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology* fourth edition. John Wiley & Sons, Inc. 869 p.
- Atlas, R. & Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology*. Addison Wesley Longman Inc, New York, 649 p.
- Barber, S. A. 1995. *Soil nutrients bioavailability: a mechanistic approach*. John Wiley & Sons, New York, 414 p.
- Barea J.M., Ferrol, N., Azcón, C. & Azcón, R. 2008. Mycorrhizal symbioses. En: *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. Pp: 142-163. Philip J. White & John P. Hammond (Eds). Springer. 296 p.
- Bar-Yosef, B., Rogers, R.D., Wolfram J.H. & Richman E. 1999. *Pseudomonas cepacia*-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Science Society of America Journal* 63: 1703-1708.
- Beauchamp, E.G. & Hume, D.J. 1997. Agricultural soil manipulation: the use of bacteria, manuring, and plowing. En: *Modern soil microbiology*. J.D. Van Elsas., J.T. Trevors. & Elizabeth Wellington (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York. 683 p.
- Bigham, J.M., Golden, D.C., Buol, S.W., Weed, S.B. & Bowen, L.H. 1978. Iron oxide mineralogy of well-drained ultisols and oxisols: II. Influence on color, surface area, and phosphate retention. *Soils Sci. Soc. Am. J.* 42: 825-830.
- Bohn, H., McNeal, B.L. & O'connor, G. 1985. *Soil chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Bolan, N.S., Naidu, R., Mahimairaja, S., & Baskaran. S. 1994. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biol. Fertil. Soils* 18:311-319.
- Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134 (2): 189-207.
- Boul, S.W. & Eswaran, H. 2000. Oxisols. *Advances in Agronomy*, 68: 151-195.
- Bowen, G.D. & Rovira, A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66: 1-102.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. 1996. *Working With Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph 32. Camberra.
- Capuchino, J. & Sherman, N. 1998. *Microbiology a laboratory manual*. Fifth edition. Benjamin/Cummings science Publishing, California. 477 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1979. Annual report for 1978. Cali, Colombia.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1982. Informe anual programa de frijol. Cali, Colombia.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1983. Oxisoles y Ultisoles en America tropical, II Mineralogía y características químicas. Cali, Colombia. 68p.

- Chien, S.H. & Hammond, L.L. 1978. A comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate rocks for direct application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:935-939.
- Dalpé, Y., Adriano de Souza, F. & Declerck S. 2005. Life cycle of *Glomus* species in monoxenic culture. *Soil Biology* 4:49-71
- Daza, M.C., Álvarez, J.G. & Rojas, L.A. 2006. Efecto de materiales orgánicos e inorgánicos sobre las fracciones de fósforo de un Oxisol de los llanos Orientales Colombianos. *Agronomía Colombiana* 24(2):326-333.
- Deacom, J. 2006. *Fungal biology* 4th Edition. Blackwell. 317 p.
- Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Igual, J.M., Muñoz, J.A., Gonzalez, F., Blazques, M.L. & Garcia, C. 2006. Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. *Soil Biol Biochem* 38: 2645–2654
- Dixon, J.B. & Weed, S.B. 1989. *Minerals in soil environments*, Second edition. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA. 1244 p.
- Drezner, Z., Turel, O. & Zerom, D. 2010. A Modified Kolmogorov-Smirnov Test for Normality. *Communications in Statistics - Simulation and Computation* 39 (4): 693-704.
- Dugan, F.M. 2006. *The identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature.* The American Phytopathological Society (APS). St. Paul, Minnesota U.S.A. 176 p.
- Dunn, O.J. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 6 241-252
- Eswaran, H., Stoops, G. & Sys, C. 1977. The micromorphology of gibbsite forms in soils. *J. Soil Sci.* 28: 136-143.
- Ferrol, N. & Pérez-Tienda. 2009. Coordinated Nutrient Exchange in Arbuscular Mycorrhiza. En: *Mycorrhizas – Functional Processes and Ecological Impact.* Pp: 72-87. Springer. Concepción Azcón-Aguilar., José Miguel Barea., Silvio Gianinazzi., Vivienne Gianinazzi (Eds). Pearson 244 p.
- Fey, M.V. & Le Roux, J. 1976. Properties and quantitative determination of poorly crystalline components in sesquioxide soil clays. *Clays Clay Miner.* 25:285-294.
- Fontes, M.P.F. 1988. Iron oxide mineralogy in some Brazilian Oxisols. Ph.D. Thesis, North Carolina State University, Raleigh (Diss. Abstr. 78-20029).
- Fontes, M.P. & Weed, S.B. 1996. Phosphate adsorption by clays from Brazilian Oxisols relationships with specific surface area and mineralogy. *Geoderma* 72: 37-51.
- Fox, R.L. & E. Kamprath. 1970. Phosphate sorption isotherms for evaluating phosphorus requirements of soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34:902-907.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-vesicular mycorrhizal infection of roots. *New Phytologist* 84:489-500.
- González. Murillo, O. A, 2006. Determinación de la dependencia micorrizal de tres especies frutales de clima frío (lulo, tomate de árbol y uchuva). Tesis (Magíster en Geomorfología y Suelos). Universidad Nacional de Colombia (Medellín). Facultad de Ciencias. 158 p.
- Goldstein, A.H. 1996. Involvement of quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. In: *Phosphate in microorganisms: Cellular and molecular biology.* Pp: 197-203. A Torriani-Gorini, E Yagil & Silver (Eds.). ASM Press, Washington, DC.

- Goldstein, A.H. & Liu, S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology* 5: 72–74.
- Grace, E.J., Smith, F. A. & Smith, S.E. 2009. Deciphering the Arbuscular Mycorrhizal Pathway of P Uptake in Non-responsive Plant Species. En: *Mycorrhizas – Functional Processes and Ecological Impact*. Pp: 88-109. Concepción Azcón-Aguilar., José Miguel Barea., Silvio Gianinazzi., Vivienne Gianinazzi-Pearson (Eds), Springer. 244 p.
- Gregory, P. 2006. *Plant roots growth, activity and interactions with soils*. Blackwell publishing. 318 p.
- Guppy, C.N., Menzies, N.W., Blamey, F.P.C. & Moody, P. 2005. Do decomposing organic matter residues reduce phosphorus sorption in highly wathered soil?. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69: 1405-1411
- Habte, M. & Osorio. N.W. 2001. *Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum*. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu. 47 p.
- Habte, M. 2006. The roles of arbuscular micorrizas in plant and soil health. En: *Biological approaches to sustainable soil system*. Pp: 129-147. Norman Uphoff., Andrew S. Ball., Erick Fernandes., Hans Herren., Olivier Husson., Mark Laing., Cheryl Palm., Jules Pretty., Pedro Sanchez., Nteranya Sanginga. & Janice Thies (Eds). Taylor & Francis group. 758 p.
- Habte, M., Fox, R. & Huang, R. 1987. Determining vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of subleaflets of an indicator plant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 18:1403-1420.
- Habte, M & Manjunath, A. 1987. Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *Leucaena leucocephala*. *Applied and Environmental Microbiology* 53(4):797-801
- Habte, M. & Manjunath, A. 1991. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza* 1:3-12.
- Habte, M. Soedarjo, M. 1996. Response of *Acacia mangium* to vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH, and soil P concentration in Oxisol. *Canadian Journal of Botany* 74:155-161.
- Halder, A. K., Mishra, A. K., Bhattacharyya, P. & Chakrabarty, P. K. 1990. Solubilization of rock phosphate by rhizobium and Bradyrhizobium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 81-92
- Halder, K., Mishra, A.K., Bhattacharyya, P. & Chakrabarty, P.K. 1990. Solubilization of rock phosphate by rhizobium and Bradyrhizobium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36, 81-92
- Hammond, L.L., Chien, S.H. & Mokwunye. A.U. 1986. Agronomic Value of Unacidulated and Partially Acidulated Phosphate Rocks Indigenous to the Tropics. *Advances in Agronomy* 40:89-140.
- He, Z.L. & Zhu, J. 1997. Transformation and bioavailability of specifically sorbed phosphate on variable-charge mineral soils. *Biology and Fertility of Soils*, 25:175-181.
- He, Z.L. & Zhu, J. 1998. Microbial utilization and transformation of phosphate adsorbed by variable charge minerals. *Soil Biology and Biochemistry* 30:917-923.
- Herbillon, A.J. 1988. Chemical estimation of weatherable minerals present in the diagnostic horizons of low activity clay soils. In: "Proceedings of the eighth international soil classification workshop, Brazil. Part 1. Papers". Pp: 39-48. F.H. Beinroth, M.N. Camargo, and H. Eswaran, (Eds). Soil Management Support Services, U.S. Dep. Agric., Washington, DC.

- Hoberg E, Marschner P, Lieberei R. 2005. Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite. *Microbiol Res* 160: 177–187
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients?. Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64: 225-265.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173–195
- Hue, N.V. 1991. Effects of organic acids/anions on P sorption and phytoavailability in soils with different mineralogies. *Soil. Sci* 152: 463-471
- Ilmer, P., Barbato, A. & Schinner, F. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27:265-270.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 1992. Fertilización en diversos cultivos. Quinta aproximación. Santafé de Bogotá. 64 p.
- Iyamuremye F, Dick RP, Baham J. 1996. Organic amendments and phosphorus dynamics. I. Phosphorus chemistry and sorption. *Soil Sci* 161: 426–435
- Jaramillo. D., Parra, L. & González, L. 1994. El recurso suelo en Colombia distribución y evolución. Universidad Nacional (Medellín), Facultad de Ciencias. 88 p.
- Jaramillo. P, S. 2006. Determinación de la dependencia micorrizal del café. Tesis (Magíster en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia (Medellín). Facultad de Ciencias, 50 p.
- Keeney, D. 1997. What goes around comes around- The nitrogen issues cycles. In: “Third int. Dahlia Greidinger Sym. On Fertilization and the environment, April 1997” J.J. Mortwedt and A. Shaviv, (Eds). Technion, Haifa, Israel.
- Kendrick, B. 2000. The fifth kingdom third edition. Canada. 373 p.
- Khasawneh, F.E. & Doll. E.C. 1979. the use of phosphate rock for direct application to soils. *Advances in Agronomy* 30:159-206.
- Kim, K.Y., McDonald, G.A. & Jordan, D. 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol. Fertil. Soils* 24:347-352.
- Kim, K.Y. Jordan, D. & McDonald. 1998a. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 26:79-87.
- Kim, K.Y. Jordan, D. & McDonald. 1998b. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soils. Effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry* 30:995-1003.
- Kirkby, E.A. & Johnston, E. 2008. Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition. En: *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Pp: 177-223. P.J. White & J.P. Hammond (Eds.) © Springer Science. 296 p.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A. & Piñeros, M. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 55: 459–493
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilising bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soil. *Can. J. Soil Sci.* 63:671-678

- Kucey, R.M.N. & Leggett, M.E. 1989. Increased yields and phosphorus uptake by westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated by a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilaji*. *Can. J. Soil Sci* 69:425-432
- Lambers, H., Shane, M.W., Cramer, M.D., Pearse, S.J. & Veneklaas, E.J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 98: 693–713
- Lindsay, W., Vlek, P. & Chien, S. 1989. Phosphate minerals. En: *Minerals Soil Environmental*. second edition. Pp : 1089-1130. J.B. Dixxon & S.B. Leed, Soil Science Society of America. 1207 p.
- Lins, I.D. & Cox, F.R. 1989. Effect of extractant and select soil properties on predicting the correct phosphorus fertilization of soybean. *Soil Sci*. 53:813-816.
- López de R, I. & Nieves, L. 1993. Efecto de los niveles de fósforo y calcio disponibles. Capacidad de adsorción de fósforo y pH del suelo sobre la reactividad de la roca fosfórica en cinco suelos ácidos de Venezuela. *Agronomía Tropical* 43 (1-2): 59-74.
- Lynch J (2007) Roots of the second green revolution. *Aust J Bot* 55: 493–512
- Lynch, J.P & Brown, K.M. 2008. Root strategies for phosphorus acquisition. En: *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Pp: 83-116. P.J. White, J.P. Hammond (Eds.) © Springer Science. 296 p.
- Lynch J.M. & Whips J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129, 1-10.
- Lynch JP, St. Clair, S.B. 2004. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crop Res* 90: 101–115
- Maarten J.C. & David E.S. 2003. *Plants, genes, and crop biotechnology*. 2nd ed. Sudbury, Mass. Jones & Bartlett. 562 p.
- Marschner, P. 2008. The role of rhizosphere microorganisms in relation to P uptake by plants. En: *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Pp: 165-176. P.J. White & J.P. Hammond (Eds.) © Springer Science. 296 p.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. & Ahern, K.G. 2002. *Biochemistry*. Third edition. Benjamin Cummings, San Francisco. 1186 p.
- Mathews, B.W., Tritschler, J.P. & Miyasaka, S.C. 1998. Phosphorus management and sustainability. En: *Grass for dairy cattle*. Pp: 193-222. J.H. Cherney & D.J.R. Cherney (Eds) CAB International. 403 p.
- Melgar, R.J., Smyth, T.J., Sánchez, P.A. & Cravo, M.S. 1992. Fertilizer nitrogen movement in a central amazon Oxisol and Entisol cropped to corn. *Fert. Res*. 31:241-252.
- Molla, M.A., Chowdhury, A.A., Islam, A. & Hoque, S. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soils. *Plant Soil* 78:393-399.
- Montoya Restrepo, B. E. 2007. Determinación de la dependencia micorrizal del aguacate (*Persea americana* Mill). Tesis (Magíster en Geomorfología y Suelos). Universidad Nacional de Colombia (Medellín). Facultad de Ciencias. 46 p.
- Moraghan, J.T. & Mascagni, H.J. 1991. Environmental and soil factors affecting micronutrient deficiencies and toxicities. In: "Micronutrients in agriculture". Pp: 371-425. Mortvedt, J.J.; Cox, F.R.; Shuman, L.M.; Welch, R.M. (Eds.), Soil Science Society of America Book Series (EUA). No. 4
- Morton, J.B. 2009. Reconciliation of Conflicting Phenotypic and rRNA Gene Phylogenies of Fungi in Glomeromycota Based on Underlying Patterns and Processes. En: *Mycorrhizas – Functional Processes*

- and Ecological Impact. Pp: 137-154. Concepción Azcón-Aguilar., José Miguel Barea., Silvio Gianinazzi., Vivienne Gianinazzi-Pearson (Eds). Springer. 244 p.
- Murphy, J. & Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31-35.
- Neumann, G. & Römheld, V. 2007. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. En: *The rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* Pp: 23-72. Roberto Pinton., Zeno Varanini., & Paolo Nannipieri (Eds), Udine, Florence. Taylor & Francis Group, 470p.
- Osorio. V, N.W. & Habte M. 2009. Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and grow of plants in the soils of the tropics. En: *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Pp: 325-351. Mohammad Saghir Khan., Almas Zaidi. & Javed Musarrat. Springer. 358 p.
- Osorio. V, N.W. 2003. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo en suelos de Hawai. Universidad Nacional (Medellín), Facultad de Ciencias. 57 p.
- Osorio, N.W. 2008. Effectiveness of microbial solubilization of phosphate in enhancing plant phosphate uptake in tropical soils and assessment of the mechanisms of solubilization. Ph.D. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu, 392 p.
- Osorio. N.W. & Pérez. J.C. 2000. Microbial solubilization of phosphates in soils. A review. En: *Uso de microorganismos en la agricultura, materia orgánica mito o realidad memorias del X Congreso de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo octubre de 2000*. pp: 103-116. Pérez, J.C., Álvarez, C.L. & Osorio, W. (Eds). Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Medellín.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B. & Melville L.H. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. CABI Publishing, Ottawa. 182 p.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Porter, W.M. 1979. The most probable number method for enumerating propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Austr. J. Soil Res.* 17:515-519.
- Prabhakaran, K.P.1996. The buffering power of plant nutrients and effects on availability. *Advances in Agronomy* 57: 237-287
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2004. *Microbiología* 5 ed. McGraw-Hill Interamericana. 1240 p.
- Primavesi, A. 2006. Soil system management in the humid and subhumid tropics. En: *Biological approaches to sustainable soil systems*. Pp: 15-26. Uphoff, N., Ball, A.S., Fernandes, E., Herren, H., Husson, O., Laing, M., Palm, C., Pretty, J., Sanchez, P., Sanging, N. & Thies, J. (Eds). Taylor & Francis Group. 785 p.
- Rajan, S.S.S., Watkinson, J.H. & Sinclair A.G. 1996. Phosphate rocks for direct application to soils. *Advances in Agronomy* 57:77-159.
- Ramírez Cuartas, C.A. 2005. Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano. Tesis (Maestría en Biotecnología) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Medellín). 169 P.
- Rao, S. 1992. *Biofertilizers in Agriculture*. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Reddy, S.R. & Reddy, S.M. 2005. *Microbial physiology*. Scientific Publishers. India. 335 p.

- Rivera, R. & Fernandez, F. 2006. Inoculation and management of mycorrhizal fungi within tropical agroecosystems. In: *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Pp: 479-489. Uphoff, N., Ball, A., Fernandes, E., Herren, H., Husson, O., Laing, M., Palm, C., Pretty, J., Sanchez, P., Sanginga, N. & Thies, J. (Eds). Taylor & Francis. United States of America.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. & Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential application for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287:15–21
- Römheld, V. & Neumann, G. 2006. The rhizosphere: Contributions of the soil – root interface to sustainable soil systems. In: *Biological approaches to sustainable soil systems*. Pp: 91-108. Uphoff, N., Ball, A., Fernandez, E., Herren, H., Husson, O., Laing, M., Palm, C., Pretty, J., Sanchez, P., Sanginga, N. & Thies, J. (Eds). Taylor & Francis. United States of America.
- Roos, W. & Luckner, M. 1984. Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *Journal of General Microbiology* 130:1007-1014.
- Rychter, A.M. & Rao, I. M. 2005. Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism Institute of experimental plant biology. 123-148 En: Mohammad Pessaraki (Ed). *Handbook of Photosynthesis* Second Edition. Taylor & Francis Group.
- Sánchez, C. 2007. Phosphorus. En: *Handbook of plant nutrition*. Pp: 51-90. Allen V. Barker & David J. Pilbeam (Eds). Taylor & Francis Group. Boca Raton. 662 P.
- Sánchez. P.A. & Salinas. J.G. 1983. Suelos ácidos. Estrategias para su manejo con bajos insumos en América tropical. Sociedad Colombiana de las Ciencias del Suelo (Eds). Santafé de Bogotá. Colombia. 93 p.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS OnlineDoc® 9.1.3. SAS Campus Drive Cary, North Carolina 27513: SAS Institute Inc.
- Shapiro S.S. & Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biométrica* 52 (3):591-611.
- Sharma, A.K. & Johri, B.N. 2002. Physiology of nutrient uptake by arbuscular mycorrhizal fungi. 279-308. En: A. Sharma. & Johri. *Arbuscular mycorrhizae interaction in plants, rhizosphere and soils science publishers, Inc. UK* 311 p.
- Shaviv, A. 2001 *Advances in Controlled Release of Fertilizers*. *Advances in Agronomy* 71:1-49.
- Sheskin, D. 2000. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures* 2nd Ed. Chapman & Hall/CRC. 982 p.
- Shane, M.W. & Lambers, H. 2005. Cluster roots: a curiosity in context. *Plant Soil* 274: 101–125
- Smith. D.R. & Moore, J. 2005. Soil extractable phosphorus changes with time after application of fertilizer: II. Manure from swine fed modified diets. *Soils Science* 170 (8): 640-651.
- Smyth, T.J. & Cravo, M.S. 1992. Aluminium and calcium constraints to continuous crop production in a Brazilian amazon oxisols. *Agron.J.* 84:843-850.
- Sparks, D. 1995. *Environmental soil chemistry*. Academic press. United States of America. 267 p.
- Soedarjo, M. & Habte, M. 1995. Mycorrhizal and nonmycorrhizal host growth in response to changes in pH and P concentration in Manganiferous Oxisol. *Mycorrhiza* 5:337-345.

- Steen, I. 1997. Phosphorus availability in the 21st century. Management of a non-renewable resource. *Phosphorus Potassium* 217: 25–31
- Stewart, B. A. & Howell, Terry A. 2003. *Encyclopedia of water science*. Marcel Dekker (Ed). New York, U.S.A. 1076 p.
- Thies, J.E. & Grossman, J.M. 2006. The soil habitat and soil ecology. In: *Biological approaches to sustainable soil systems*. Pp: 59-78. Uphoff, N., Ball, A., Fernades, E., Herren, H., Husson, O., Laing, M., Palm, C., Pretty, J., Sanchez, P., Sanginga, N. & Thies, J. (Eds). Taylor & Francis Group. United States of America. 785 p.
- Trakoonyingcharoen, P., Kheoruenromne, I., Suddhiprakarn, A. & Gilkes, R.J. 2005. Phosphate sorption by Thai red Oxisols and red Ultisols. *Soil Science* 170 (9): 716-725
- Turner, B.L. Frossard, E. & Oberson, A. 2006. Enhancing phosphorus availability in low-fertility soils. En: *Biological approaches to sustainable soil system*. Pp: 191-205. Norman Uphoff., Andrew S. Ball., Erick Fernandes., Hans Herren., Olivier Husson., Mark Laing., Cheryl Palm., Jules Pretty., Pedro Sanchez., Nteranya Sanginga. & Janice Thies, Taylor & Francis group. 758 p.
- Uren, N.C. 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. En: *The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* Pp: 1-21. Roberto Pinton., Zeno Varanini., & Paolo Nannipieri (Eds), Udine, Florence. Taylor & Francis Group, 470 p.
- Venkateswardu, B., Rao, A.V. & Raina, P. 1984. Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from Aridisols. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 32:273-277.
- Vance, C.P. 2008. Plants without arbuscular mycorrhizae. En: *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. Pp: 117-142 P.J. White, J.P. Hammond (Eds.). © Springer Science. 296 p.
- Vosátka, M. & Albrechtova, J. 2009. Benefits of arbuscular mycorrhizal fungi to sustainable crop production. En: *Microbial Strategies for Crop Improvement*. Pp: 203-225. Mohammad Saghir Khan., Almas Zaidi. Javed Musarrat. Springer. 358 p.
- Webster, J. & Weber, E.S. 2007. *Introduction to Fungi Third Edition*. Cambridge University Press. 875 p.
- Whipps, J.M. & Lynch, J.M. 1986. The influence of the rhizosphere on crop productivity. *Adv. Microbial. Ecol.* 9:187-244.
- Whitehead, D. 2008. *Nutrient elements in grassland soil-plant-animal relationships*. CABI Publishing 396 p.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69: 99-151.
- Winch, T. 2006. *Growing Food a Guide to Food Production*. Springer. 341p.
- World Bank. 2004. *World development indicators*. Washington, DC
- Yu, T.R. 1997. *Chemistry of variable charge soils*. Oxford University Press. 505 p.
- Zahir, A.Z., Muhammad A. & Frankenberger, William T.J. 2003. Plant Growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81: 97-168
- Zaidi, A. & Khan, M.S. 2006. Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. *Turk J. Agric. For* 30: 223-230

- Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemad, M., Oves, M. & Wani, P.A. 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. En: Microbial strategies for crop improvement. Pp: 23-50. Mohammad Saghir Khan., Almas Zaidi & Javed Musarrat (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 358 p.
- Zapata, R. 2004. Química de la acidez del suelo. Universidad Nacional de Colombia (Medellín). Facultad de Ciencias. 208 p.

9 **ANEXOS**

Anexo 1. Experimento 1, regresión lineal para la isoterma de adsorción de Pi en el Oxisol de Santander de Quilichao (Cauca).

Procedimiento REG							
Modelo: MODEL1							
Variable dependiente: P_sorbido P sorbido							
Number of Observations Read					110		
Number of Observations Used					110		
Análisis de la varianza							
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F		
Modelo	1	10986623	10986623	3291.68	<.0001		
Error	108	360471	3337.69785				
Total corregido	109	11347094					
Raíz MSE		57.77281	R-cuadrado	0.9682			
Media dependiente		436.51202	R-Cuad Adj	0.9679			
Var Coeff		13.23510					
Estimadores del parámetro							
Variable	Etiqueta	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t	Estimador estandarizado
Intercept	Intercept	1	637.40587	6.52713	97.65	<.0001	0
P_sln_log		1	192.24762	3.35083	57.37	<.0001	0.98399

Anexo 2. Experimento 1, modelo linealizado de Lagnmuir

Máxima capacidad de sorción y K

La máxima capacidad del Oxisol para sorber Pi se calcula con la ecuación (1), b es la pendiente de la recta de regresión lineal que se obtiene al graficar el P (mg L⁻¹) solución en la abscisa contra [P solución (mg L⁻¹) / P sorbido (mg kg⁻¹)]. El P sorbido (mg kg⁻¹) se obtiene con (2).

$$\text{Máxima sorción: } 1/b \tag{1}$$

$$\text{P sorbido mg kg}^{-1} = [\text{dosis mg P kg}^{-1} * 0.003 \text{ kg} - \text{P sln mg P L}^{-1} * 0.03\text{L}] / 0.003 \text{ kg} \tag{2}$$

Reemplazando en (2) se tiene (3):

$$\text{P sorbido mg kg}^{-1} = [50 \text{ mg P kg}^{-1} * 0.003 \text{ kg} - 0.0517731 \text{ mg P L}^{-1} * 0.03\text{L}] / 0.003 \text{ kg} = 49.482269 \text{ mg P kg}^{-1}. \tag{3}$$

$$\text{Cp} / \text{P sorbido} = [\text{P solución (mg L}^{-1}) / \text{P sorbido (mg kg}^{-1})] \tag{4}$$

Reemplazando en (4) se tiene (5):

$$\text{Cp} / \text{P sorbido} = [0.0517731 \text{ mg P L}^{-1} / 49.482269 \text{ mg P kg}^{-1}] = 0.00104629 \tag{5}$$

De la figura 2 se extrae la ecuación de regresión $y = 0.00092474 * P \text{ sln} + 0.00061543$, para extraer la pendiente y hallar la máxima sorción aplicando la formula (1), reemplazando se tiene:

$$\text{Máxima porción (k): } 1/0.00092474 = 1081.38 \text{ mg P kg}^{-1}$$

Para obtener el valor K (6) se divide el intercepto por la razón de cambio o pendiente, de la ecuación de la figura 2, a si:

$$K = 0.00061543 / 0.00092474 = 0.6655 \approx 0.7$$

(6)

Anexo 3. Experimento 1, análisis estadístico de la desorción con MSP+ y MSP-

t Tests (LSD) para Desorción MSP- $\log(PsIn)$

NOTA: Este test controla el índice de error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	48
Error de cuadrado medio	0.012937
Valor crítico de t	2.01063
Diferencia menos significativa	0.1446

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	Número de observaciones	P_mg_kg_1
A	-0.13851	5	1000
B	-0.45239	5	833.3
B	-0.47545	5	900
C	-1.14151	5	633.3
D	-1.46926	5	500
E	-1.75836	5	383.3
F	-2.20731	5	250
G	-2.41859	5	183.3
H	-2.76940	5	83.3
H	-2.79350	5	100
I	-2.96181	5	0
I	-2.97789	5	50

t Tests (LSD) para Desorción MSP- $\log(PsIn)$

NOTA: Este test controla el índice de error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	48
Error de cuadrado medio	0.019054
Valor crítico de t	2.01063
Diferencia menos significativa	0.1755

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	Número de observaciones	P_mg_kg_1
A	-0.06924	5	1000
B	-0.40849	5	900
B	-0.44963	5	833.3
C	-1.34657	5	633.3
D	-1.55886	5	500
E	-1.97115	5	383.3
F	-2.56183	5	250
G	-2.96445	5	183.3
H	-3.15921	5	50
H	-3.24088	5	83.3
H	-3.25799	5	100
I	-3.37293	5	0

Anexo 4. Experimento 2, análisis estadísticos variable P (mg L⁻¹) en solución

1975-1985, 1987, 1988, 1989

Procedimiento REG
Modelo: MODEL1
Variable dependiente: P_mg_L_1 P mg L-1

Number of Observations Read 21
Number of Observations Used 21

Análisis de la varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	7049.58264	3524.79132	147.18	<.0001
Error	18	431.07181	23.94843		
Total corregido	20	7480.65446			

Raíz MSE	4.89371	R-cuadrado	0.9424
Media dependiente	43.07514	R-Cuad Adj	0.9360
Var Coeff	11.36088		

Estimadores del parámetro

Variable	Etiqueta	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t	Type I SS
Intercept	Intercept	1	-28.44028	4.40305	-6.46	<.0001	38965
RP_g_L_1	RP g L-1	1	74.67396	5.04668	14.80	<.0001	3233.10640
RP_g_L_1_2	2nd power of RP_G_L_1	1	-15.56650	1.23310	-12.62	<.0001	3816.47624

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango múltiple de Duncan para P_mg_L_1

NOTA: Este test controla el índice error comparisionwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa						0.05
Error de grados de libertad						14
Error de cuadrado medio						9.153801
Número de medias	2	3	4	5	6	7
Rango crítico	5.298	5.552	5.708	5.814	5.889	5.943

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	RP_g_L_1
A	61.708	3	2
B	54.846	3	2.5
B	53.497	3	1.5
B	52.090	3	3
C	45.991	3	3.5
D	30.391	3	1
E	3.003	3	0.5

Anexo 5. Experimento 2, análisis estadísticos. variable pH del medio de cultivo de Osorio (2008) para solubilizadores de roca fosfórica.

Procedimiento REG
 Modelo: MODEL1
 Variable dependiente: pH_final pH final
 Number of Observations Read 21
 Number of Observations Used 21

Análisis de la varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1.89348	0.63116	41.28	<.0001
Error	17	0.25993	0.01529		
Total corregido	20	2.15341			

Raíz MSE 0.12365 R-cuadrado 0.8793
 Media dependiente 2.85252 R-Cuad Adj 0.8580
 Var Coeff 4.33489

Estimadores del parámetro

Variable	Etiqueta	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t	Type I SS
Intercept	Intercept	1	1.43914	0.20726	6.94	<.0001	170.87473
RP_g_L_1	RP g L-1	1	1.84994	0.41824	4.42	0.0004	1.41207
RP_g_L_1_2	2nd power of RP_G_L_1	1	-0.71925	0.23524	-3.06	0.0071	0.39279
RP_g_L_1_3	3rd power of RP_G_L_1	1	0.09356	0.03886	2.41	0.0277	0.08862

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango múltiple de Duncan para pH_final

NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 14
 Error de cuadrado medio 0.015206

Número de medias	2	3	4	5	6	7
Rango crítico	.2159	.2263	.2327	.2370	.2400	.2422

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	RP_g_L_1
A	3.1420	3	3.5
A	3.0570	3	2.5
A	3.0327	3	2
A	2.9733	3	3
A	2.9527	3	1.5
B	2.5833	3	1
C	2.2267	3	0.5

Anexo 6. Experimento 2, Análisis estadísticos variable biomasa fúngica (g) en el medio de cultivo de para solubilizadores de roca fosfórica.

Procedimiento REG
 Modelo: MODEL1
 Variable dependiente: biomasa_g_ biomasa (g)

Number of Observations Read 21
 Number of Observations Used 21

Análisis de la varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.07317	0.03659	265.26	<.0001
Error	18	0.00248	0.00013793		
Total corregido	20	0.07566			

Raíz MSE	0.01174	R-cuadrado	0.9672
Media dependiente	0.27885	R-Cuad Adj	0.9635
Var Coeff	4.21170		

Estimadores del parámetro

Variable	Etiqueta	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t	Estimador estandarizado
Intercept	Intercept	1	0.20574	0.00464	44.31	<.0001	0
RP3		1	0.01329	0.00149	8.90	<.0001	3.25848
RP4		1	-0.00271	0.00042532	-6.36	<.0001	-2.32917

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango múltiple de Duncan para biomasa_g_

NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 14
 Error de cuadrado medio 0.000093

Número de medias	2	3	4	5	6	7
Rango crítico	.01690	.01771	.01821	.01855	.01879	.01896

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	RP_g_L_1
A	0.366067	3	3.5
A	0.357767	3	3
B	0.294133	3	2.5
C	0.272100	3	2
D	0.236067	3	1.5
D			
E	0.221300	3	1
E			
E	0.204500	3	0.5

Anexo 7. Experimento 3, análisis estadísticos variable P (mg L⁻¹) en solución.

Procedimiento REG
 Modelo: MODEL1
 Variable dependiente: P_sln_ P sln

Number of Observations Read 40
 Number of Observations Used 40

Análisis de la varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	5042.32345	1260.58086	85.81	<.0001
Error	35	514.16064	14.69030		
Total corregido	39	5556.48409			

Raíz MSE 3.83279 R-cuadrado 0.9075
 Media dependiente 45.88457 R-Cuad Adj 0.8969
 Var Coeff 8.35312

Estimadores del parámetro

Variable	Etiqueta	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t	Estimador estandarizado
Intercept	Intercept	1	-29.90189	6.00736	-4.98	<.0001	0
GLUCOSA2		1	-2.63173	0.39469	-6.67	<.0001	-44.79660
glucosa_	glucosa_	1	24.83286	2.78301	8.92	<.0001	14.99997
GLUCOSA3		1	0.11517	0.02150	5.36	<.0001	49.84400
GLUCOSA4		1	-0.00178	0.00039351	-4.51	<.0001	-13.22423

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango múltiple de Duncan para P_sln_

NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 32
 Error de cuadrado medio 15.66865

Número de medias	2	3	4	5	6	7	8
Rango crítico	5.099	5.360	5.529	5.650	5.741	5.813	5.871

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	glucosa_
A	52.344	5	25
A	52.210	5	10
A	51.008	5	20
A	50.874	5	7.5
A	50.574	5	12.5
A	50.273	5	15
B	42.657	5	5
C	17.136	5	2.5

Anexo 8. Experimento 3, análisis estadísticos variable pH del medio de cultivo

Procedimiento NPAR1WAY

Puntuaciones de Wilcoxon (Sumas de rango) para la variable pH_final
 Clasificado por la variable glucosa_

glucosa_	Número de observaciones	Suma de puntuaciones	Esperado debajo de H0	Std Dev debajo de H0	Puntuación de la media
2.5	5	178.00	102.50	24.450041	35.60
5	5	152.00	102.50	24.450041	30.40
7.5	5	159.00	102.50	24.450041	31.80
10	5	112.50	102.50	24.450041	22.50
12.5	5	97.50	102.50	24.450041	19.50
15	5	60.00	102.50	24.450041	12.00
20	5	27.00	102.50	24.450041	5.40
25	5	34.00	102.50	24.450041	6.80

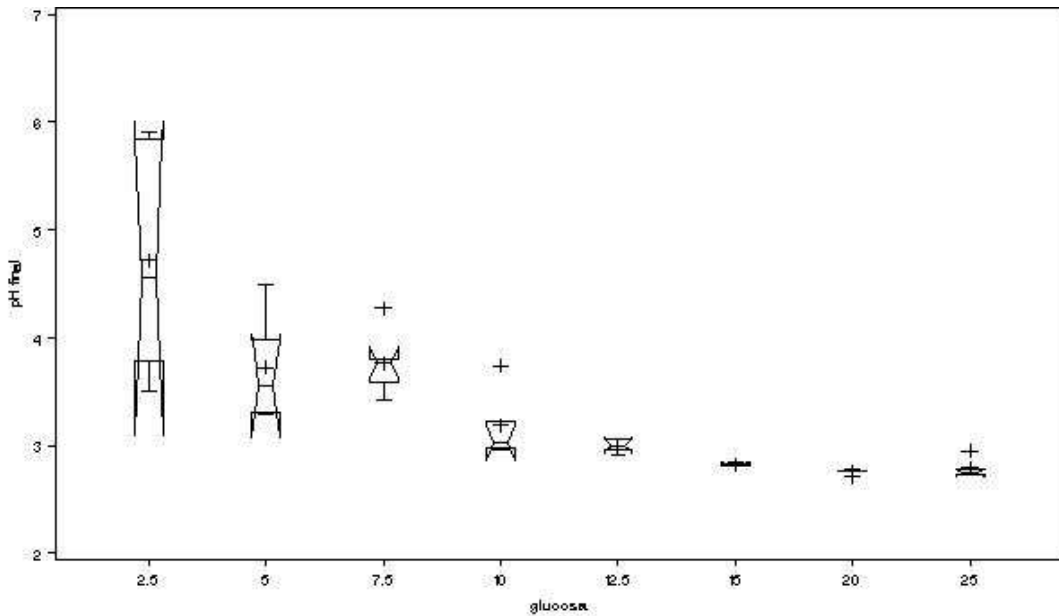
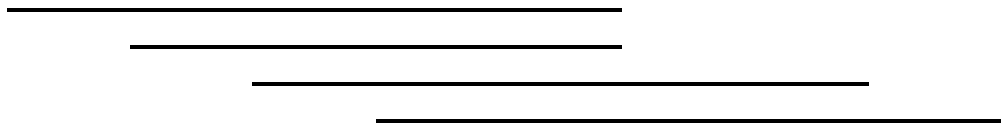
Se utilizaron las puntuaciones de la media para igualdad de rango.

Test de Kruskal-Wallis

Chi-cuadrado 34.6404
 DF 7
 Pr > Chi-cuadrado <.0001

Resultado de la prueba de comparación de Dunn (1964) para los rangos medios

Glucosa g L ⁻¹	20	25	15	12,5	10	5	7,5	2,5
Suma de rangos	27	34	60	98	112	152	159	178
Rango medio	5,4	6,8	12	19,6	22,4	30,4	31,8	35,6
Valor crítico	21,6							



Anexo 9. Experimento 3, análisis estadísticos variable biomasa fúngica (g)

Procedimiento REG
 Modelo: MODEL1
 Variable dependiente: Biomasa_ Biomasa
 Number of Observations Read 40
 Number of Observations Used 40

Análisis de la varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	0.52244	0.52244	240.71	<.0001
Error	38	0.08248	0.00217		
Total corregido	39	0.60492			

Raíz MSE	0.04659	R-cuadrado	0.8637
Media dependiente	0.29657	R-Cuad Adj	0.8601
Var Coeff	15.70876		

Estimadores del parámetro

Variable	Etiqueta	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t	Estimador estandarizado
Intercept	Intercept	1	0.10093	0.01460	6.91	<.0001	0
glucosa_	glucosa	1	0.01605	0.00103	15.51	<.0001	0.92933

Procedimiento ANOVA
 Prueba del rango múltiple de Duncan para Biomasa_
 NOTA: Este test controla el índice error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	32
Error de cuadrado medio	0.002264

Número de medias	2	3	4	5	6	7	8
Rango crítico	.06130	.06443	.06646	.06791	.06901	.06988	.07058

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	Número de observaciones	glucosa_
A	0.48180	5	25
A	0.42610	5	20
B	0.35760	5	15
B	0.30642	5	12.5
C	0.27192	5	10
C	0.24360	5	7.5
C			
C			
D	0.16182	5	5
D	0.12333	5	2.5
D			

Procedimiento GLM
Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
HM	2	0 1
MSP	2	0 1
RP	5	0 75 150 300 600

Número de observaciones leídas 80
Número de observaciones usadas 80

Procedimiento GLM

Variable dependiente: dia_17_exp

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	19	5781.59047	304.29424	0.77	0.7324
Error	60	23747.13168	395.78553		
Total correcto	79	29528.72215			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	dia_17_exp Media
0.195795	55.48092	19.89436	35.85802

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
HM	1	67.502106	67.502106	0.17	0.6811
MSP	1	114.542210	114.542210	0.29	0.5926
RP	4	1780.070502	445.017625	1.12	0.3536
HM*MSP	1	469.953794	469.953794	1.19	0.2802
HM*RP	4	2573.030131	643.257533	1.63	0.1796
MSP*RP	4	510.417096	127.604274	0.32	0.8619
HM*MSP*RP	4	266.074627	66.518657	0.17	0.9538

Anexo 11. Experimento 4, análisis estadísticos variable P ($\mu\text{g pinulo}$) foliar día 30

Procedimiento GLM
Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
HM	2	0 1
MSP	2	0 1
RP	5	0 75 150 300 600

Número de observaciones leídas 80
Número de observaciones usadas 80

Procedimiento GLM

Variable dependiente: dia_30 dia 30

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	19	24.10801133	1.26884270	5.71	<.0001
Error	60	13.33850548	0.22230842		
Total correcto	79	37.44651681			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	dia_30 Media
0.643798	24.62628	0.471496	1.914605

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
HM	1	11.49714160	11.49714160	51.72	<.0001
MSP	1	2.22440231	2.22440231	10.01	0.0024
RP	4	3.18319894	0.79579974	3.58	0.0110
HM*MSP	1	2.31805324	2.31805324	10.43	0.0020
HM*RP	4	2.99633838	0.74908460	3.37	0.0149
MSP*RP	4	0.68094610	0.17023653	0.77	0.5517
HM*MSP*RP	4	1.20793075	0.30198269	1.36	0.2591

Procedimiento GLM
Medias de cuadrados mínimos

	HM	MSP	dia_30 LSMEAN	Número LSMEAN
	0	0	1.53203400	1
	0	1	1.53898200	2
	1	0	2.63067210	3
	1	1	1.95673050	4

Medias de cuadrados mínimos para el efecto HM*MSP
Pr > |t| para H0: MediaLS(i)=MediaLSn(j)

Variable dependiente: dia_30

i/j	1	2	3	4
1		0.9630	<.0001	0.0060
2	0.9630		<.0001	0.0068
3	<.0001	<.0001		<.0001
4	0.0060	0.0068	<.0001	

NOTA: Para asegurar un nivel de protección completo, sólo se deben usar probabilidades asociadas con comparaciones preplanificadas .

17:50 Monday, May 3, 2010 7

Procedimiento GLM
Medias de cuadrados mínimos

	HM	RP	dia_30 LSMEAN	Número LSMEAN
	0	0	1.45473750	1
	0	75	1.42216875	2
	0	150	1.46559375	3
	0	300	1.66317750	4
	0	600	1.67186250	5
	1	0	1.66563900	6
	1	75	2.35501875	7
	1	150	2.81709225	8
	1	300	2.45713950	9
	1	600	2.17361700	10

Medias de cuadrados mínimos para el efecto HM*RP
Pr > |t| para H0: MediaLS(i)=MediaLSn(j)

Variable dependiente: dia_30

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.8906	0.9634	0.3801	0.3607	0.3746	0.0003	<.0001	<.0001	0.0034
2	0.8906		0.8545	0.3107	0.2938	0.3059	0.0002	<.0001	<.0001	0.0023
3	0.9634	0.8545		0.4053	0.3851	0.3995	0.0004	<.0001	<.0001	0.0039
4	0.3801	0.3107	0.4053		0.9707	0.9917	0.0047	<.0001	0.0013	0.0344
5	0.3607	0.2938	0.3851	0.9707		0.9790	0.0052	<.0001	0.0015	0.0374
6	0.3746	0.3059	0.3995	0.9917	0.9790		0.0049	<.0001	0.0014	0.0352
7	0.0003	0.0002	0.0004	0.0047	0.0052	0.0049		0.0546	0.6664	0.4446
8	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0546		0.1321	0.0083
9	<.0001	<.0001	<.0001	0.0013	0.0015	0.0014	0.6664	0.1321		0.2338
10	0.0034	0.0023	0.0039	0.0344	0.0374	0.0352	0.4446	0.0083	0.2338	

Anexo 12. Experimento 4, análisis estadísticos variable P foliar (μg pinulo) día 45

Procedimiento GLM						
Información de nivel de clase						
Clase	Niveles	Valores				
HM	2	0 1				
MSP	2	0 1				
RP	5	0 75 150 300 600				
Número de observaciones leídas						80
Número de observaciones usadas						80
Procedimiento GLM						
Variable dependiente: dia_45_log						
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
Modelo	19	33.34985201	1.75525537	25.61	<.0001	
Error	60	4.11272959	0.06854549			
Total correcto	79	37.46258159				
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	dia_45_log Media		
	0.890218	28.70590	0.261812	0.912049		
Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
HM	1	31.68741807	31.68741807	462.28	<.0001	
MSP	1	0.42892327	0.42892327	6.26	0.0151	
RP	4	0.35079502	0.08769875	1.28	0.2881	
HM*MSP	1	0.21079721	0.21079721	3.08	0.0846	
HM*RP	4	0.19726626	0.04931657	0.72	0.5820	
MSP*RP	4	0.29237305	0.07309326	1.07	0.3811	
HM*MSP*RP	4	0.18227913	0.04556978	0.66	0.6189	

Anexo 13. Experimento 4, análisis estadísticos variable P (μg pinulo) foliar día 60

Procedimiento GLM			
Información de nivel de clase			
Clase	Niveles	Valores	
HM	2	0 1	
MSP	2	0 1	
RP	5	0 75 150 300 600	
Número de observaciones leídas			80
Número de observaciones usadas			80

Procedimiento GLM

Variable dependiente: dia_60_log

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	19	64.95216745	3.41853513	56.10	<.0001
Error	60	3.65634888	0.06093915		
Total correcto	79	68.60851633			

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE dia_60_log Media
 0.946707 34.27020 0.246859 0.720330

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
HM	1	63.35243265	63.35243265	1039.60	<.0001
MSP	1	0.17771792	0.17771792	2.92	0.0929
RP	4	0.62202346	0.15550586	2.55	0.0481
HM*MSP	1	0.37937378	0.37937378	6.23	0.0154
HM*RP	4	0.21194337	0.05298584	0.87	0.4876
MSP*RP	4	0.10951743	0.02737936	0.45	0.7725
HM*MSP*RP	4	0.09915884	0.02478971	0.41	0.8030

Procedimiento GLM
 Medias de cuadrados mínimos

	HM	MSP	dia_60_log LSMEAN	Número LSMEAN
	0	0	-0.14782969	1
	0	1	-0.19129153	2
	1	0	1.49422479	3
	1	1	1.72621668	4

Medias de cuadrados mínimos para el efecto HM*MSP
 Pr > |t| para H0: MediaLS(i)=MediaLSn(j)

Variable dependiente: dia_60_log

i/j	1	2	3	4
1		0.5798	<.0001	<.0001
2	0.5798		<.0001	<.0001
3	<.0001	<.0001		0.0043
4	<.0001	<.0001	0.0043	

Anexo 14. Experimento 4, análisis estadísticos variable P (µg pinulo) foliar día 75

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable dia_75
 Classified by Variable TTOS

TTOS	N	Sum of Scores	Expected Under H0	Std Dev Under H0	Mean Score
Control	20	435.50	810.0	89.975735	21.7750
MSP	20	384.50	810.0	89.975735	19.2250
HM	20	1081.00	810.0	89.975735	54.0500
HM & MSP	20	1339.00	810.0	89.975735	66.9500

Average scores were used for ties.

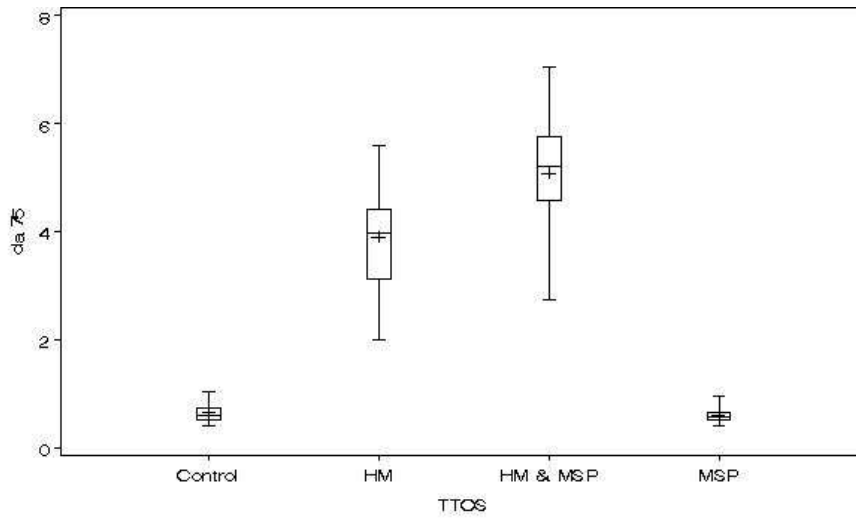
Kruskal-Wallis Test

Chi-Square 62.4950
 DF 3
 Pr > Chi-Square <.0001

Resultado de la prueba de comparación de Dunn (1964) para los rangos medios

Nivel de inoculación	Control	MSP	HM	HM & MSP
Suma de rangos	435.5	384.5	1081	1339
Rango medio	22	19	54	67

Valor crítico 19.4



Anexo 15. Experimento 4, análisis estadísticos variable biomasa seca aérea (g) de leucaena

```

The GLM Procedure
Class Level Information
Class      Levels  Values
HM         2      0 1
MSP        2      0 1
RP         5      0 75 150 300 600

Number of observations  80
    
```

The GLM Procedure

Dependent Variable: biomasa_aerea_g_log

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	77.89813496	4.09990184	108.73	<.0001
Error	60	2.26250990	0.03770850		
Corrected Total	79	80.16064486			

R-Square Coeff Var Root MSE biomasa_aerea_g_log Mean
 0.971775 -102.0574 0.194187 -0.190272

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HM	1	76.17852354	76.17852354	2020.20	<.0001
MSP	1	0.46830820	0.46830820	12.42	0.0008
RP	4	0.44515797	0.11128949	2.95	0.0271
HM*MSP	1	0.31069814	0.31069814	8.24	0.0057
HM*RP	4	0.32439041	0.08109760	2.15	0.0855
MSP*RP	4	0.08220482	0.02055121	0.55	0.7033
HM*MSP*RP	4	0.08885188	0.02221297	0.59	0.6718

The GLM Procedure
 Least Squares Means

		biomasa_aerea_g_log	LSMEAN
HM	MSP	log LSMEAN	Number
0	0	-1.18028646	1
0	1	-1.15190462	2
1	0	0.64672147	3
1	1	0.92438153	4

Least Squares Means for effect HM*MSP
 Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: biomasa_aerea_g_log

i/j	1	2	3	4
1		0.6456	<.0001	<.0001
2	0.6456		<.0001	<.0001
3	<.0001	<.0001		<.0001
4	<.0001	<.0001	<.0001	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

Anexo 16. Experimento 4, análisis estadísticos variable pH del suelo rizosferico al final del ensayo

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
HM	2	0 1
MSP	2	0 1
RP	5	0 75 150 300 600

Number of observations 80

The GLM Procedure

Dependent Variable: pH_final_log

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	0.14370761	0.00756356	16.75	<.0001
Error	60	0.02708788	0.00045146		
Corrected Total	79	0.17079549			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	pH_final_log Mean
0.841402	1.237327	0.021248	1.717226

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HM	1	0.11657296	0.11657296	258.21	<.0001
MSP	1	0.00082146	0.00082146	1.82	0.1824
RP	4	0.00651160	0.00162790	3.61	0.0106
HM*MSP	1	0.00680997	0.00680997	15.08	0.0003
HM*RP	4	0.00792370	0.00198092	4.39	0.0035
MSP*RP	4	0.00120395	0.00030099	0.67	0.6176
HM*MSP*RP	4	0.00386398	0.00096600	2.14	0.0869

The GLM Procedure
Least Squares Means

HM	MSP	pH_final_log LSMEAN	LSMEAN Number
0	0	1.74296825	1
0	1	1.76782967	2
1	0	1.68507526	3
1	1	1.67303149	4

Least Squares Means for effect HM*MSP
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: pH_final_log				
i/j	1	2	3	4
1		0.0005	<.0001	<.0001
2	0.0005		<.0001	<.0001
3	<.0001	<.0001		0.0781
4	<.0001	<.0001	0.0781	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

The GLM Procedure
Least Squares Means

HM	RP	pH_final_log LSMEAN	LSMEAN Number
0	0	1.75320997	1
0	75	1.75977167	2
0	150	1.76397721	3
0	300	1.74015403	4
0	600	1.75988192	5
1	0	1.66986358	6
1	75	1.65571095	7
1	150	1.67666822	8
1	300	1.68627033	9
1	600	1.70675381	10

Least Squares Means for effect HM*RP
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: pH_final_log

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.5392	0.3149	0.2239	0.5324	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
2	0.5392		0.6936	0.0697	0.9918	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
3	0.3149	0.6936		0.0286	0.7012	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
4	0.2239	0.0697	0.0286		0.0682	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0026
5	0.5324	0.9918	0.7012	0.0682		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
6	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		0.1878	0.5243	0.1278	0.0010
7	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1878		0.0531	0.0056	<.0001
8	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.5243	0.0531		0.3697	0.0063
9	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1278	0.0056	0.3697		0.0586
10	<.0001	<.0001	<.0001	0.0026	<.0001	0.0010	<.0001	0.0063	0.0586	

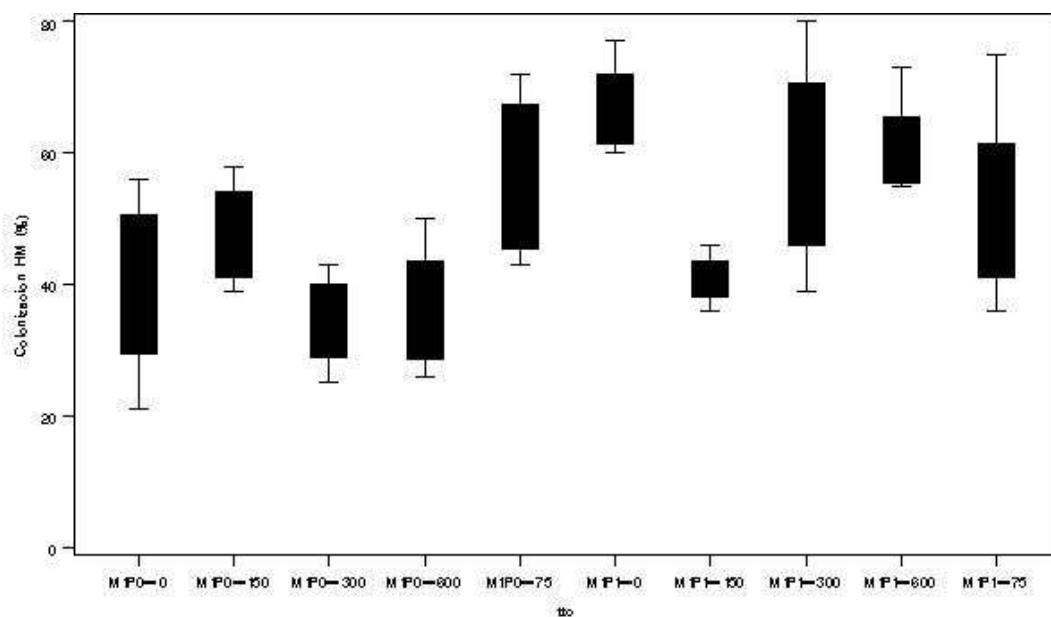
NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

Anexo 17. Experimento 4, análisis estadísticos variable colonización micorrizal (%)

The MEANS Procedure

Analysis Variable : Colonizacion_HM____

tto	N Obs	Mean	Std Dev	N	Minimum	Maximum
M0P0-0	4	0	0	4	0	0
M0P0-150	4	0	0	4	0	0
M0P0-300	4	0	0	4	0	0
M0P0-600	4	0	0	4	0	0
M0P0-75	4	0	0	4	0	0
M0P1-0	4	0	0	4	0	0
M0P1-150	4	0	0	4	0	0
M0P1-300	4	0	0	4	0	0
M0P1-600	4	0	0	4	0	0
M0P1-75	4	0	0	4	0	0
M1P0-0	4	40.0000000	14.6742405	4	21.0000000	56.0000000
M1P0-150	4	47.5000000	8.3466560	4	39.0000000	58.0000000
M1P0-300	4	34.5000000	7.5498344	4	25.0000000	43.0000000
M1P0-600	4	36.0000000	10.3601802	4	26.0000000	50.0000000
M1P0-75	4	56.5000000	13.3790882	4	43.0000000	72.0000000
M1P1-0	4	66.7500000	7.4105780	4	60.0000000	77.0000000
M1P1-150	4	40.7500000	4.1129876	4	36.0000000	46.0000000
M1P1-300	4	58.2500000	17.1148084	4	39.0000000	80.0000000
M1P1-600	4	60.5000000	8.4261498	4	55.0000000	73.0000000
M1P1-75	4	51.2500000	16.6808273	4	36.0000000	75.0000000



Anexo 18. Experimento 4, análisis estadísticos variable colonización *Mortierella* sp. (%)

The MEANS Procedure
Analysis Variable : colonizacion_MSP__

tto	N Obs	Mean	Std Dev	N	Minimum	Maximum
M0P0-0	4	0	0	4	0	0
M0P0-150	4	0	0	4	0	0
M0P0-300	4	0	0	4	0	0
M0P0-600	4	0	0	4	0	0
M0P0-75	4	0	0	4	0	0
M0P1-0	4	81.2500000	4.7871355	4	75.0000000	85.0000000
M0P1-150	4	86.2500000	10.3077641	4	75.0000000	100.0000000
M0P1-300	4	81.2500000	15.4784797	4	60.0000000	95.0000000
M0P1-600	4	83.7500000	13.1497782	4	70.0000000	95.0000000
M0P1-75	4	76.2500000	11.0867789	4	65.0000000	90.0000000
M1P0-0	4	0	0	4	0	0
M1P0-150	4	0	0	4	0	0
M1P0-300	4	0	0	4	0	0
M1P0-600	4	0	0	4	0	0
M1P0-75	4	0	0	4	0	0
M1P1-0	4	82.5000000	8.6602540	4	70.0000000	90.0000000
M1P1-150	4	81.2500000	7.5000000	4	75.0000000	90.0000000
M1P1-300	4	78.7500000	14.3614066	4	70.0000000	100.0000000
M1P1-600	4	86.2500000	10.3077641	4	75.0000000	100.0000000
M1P1-75	4	71.2500000	6.2915287	4	65.0000000	80.0000000

Anexo 19. Experimento 4, análisis estadísticos variable P total absorbido ($\mu\text{g/planta}$) al momento de la cosecha

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
HM	2	0 1
MSP	2	0 1
RP	5	0 75 150 300 600

Number of observations 80

The GLM Procedure

Dependent Variable: P_total_ug_planta_log

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	175.6921073	9.2469530	90.52	<.0001
Error	60	6.1290026	0.1021500		
Corrected Total	79	181.8211099			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	P_total_ug_planta_log Mean
0.966291	-108.2960	0.319609	-0.295126

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HM	1	171.3384808	171.3384808	1677.32	<.0001
MSP	1	0.4771701	0.4771701	4.67	0.0347
RP	4	2.3474511	0.5868628	5.75	0.0006
HM*MSP	1	0.2936929	0.2936929	2.88	0.0951
HM*RP	4	0.5656571	0.1414143	1.38	0.2502
MSP*RP	4	0.3936457	0.0984114	0.96	0.4343
HM*MSP*RP	4	0.2760096	0.0690024	0.68	0.6116

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for P_total_ug_planta_log

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	60
Error Mean Square	0.10215
Critical Value of t	2.00030
Least Significant Difference	0.143

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	HM
A	1.16834	40	1
B	-1.75859	40	0

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for P_total_ug_planta_log

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 60
 Error Mean Square 0.10215
 Critical Value of t 2.00030
 Least Significant Difference 0.143

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	MSP
A	-0.21789	40	1
B	-0.37236	40	0

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for P_total_ug_planta_log

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 60
 Error Mean Square 0.10215
 Critical Value of t 2.00030
 Least Significant Difference 0.226

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	RP
A	-0.0515	16	150
A			
B A	-0.2086	16	300
B A			
B A	-0.2677	16	600
B A			
B C	-0.3865	16	75
C			
C	-0.5612	16	0