



ORIGINAL

Combinación de hongos movilizadores y solubilizadores de fósforo con rocas fosfóricas y materiales volcánicos para la promoción del crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)



María S. Velázquez^{a,*}, Marta N. Cabello^{a,b}, Lorena A. Eliades^a, María L. Russo^a, Natalia Allegrucci^a y Santiago Schalamuk^c

^a Instituto de Botánica Carlos Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo-Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

^b Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), La Paz, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^c Centro de Química Inorgánica, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 6 de octubre de 2015; aceptado el 7 de julio de 2016

Disponible en Internet el 12 de octubre de 2017

PALABRAS CLAVE

Hongos solubilizadores de P; Hongos movilizadores de P; Roca fosfórica; Cenizas volcánicas

Resumen Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) incrementan la toma de fosfatos solubles, mientras que los hongos solubilizadores de fósforo (S) promueven la solubilización de complejos insolubles de fosfato, en conjunto benefician la nutrición de las plantas. La utilización de estos organismos en combinación con minerales o rocas que aportan nutrientes es otra alternativa para mantener la productividad de los cultivos. El objetivo de este trabajo fue combinar HMA y S con materiales piroclásticos (cenizas y pumicitas) del volcán Puyehue y rocas fosfóricas (RP) del Grupo Río Chico (Chubut) y evaluar el desempeño de estas mezclas como sustratos para la producción en maceta de *Lactuca sativa*. Para formular los sustratos, se utilizó como base una mezcla de Terrafertil[®] con cenizas. *Penicillium thomii* fue el S y esporas del hongo *Rhizophagus intraradices* (AEGIS[®] Irriga) sirvieron de fuente del HMA. Se evaluaron diversas combinaciones de microorganismos y la adición o no de RP. Los tratamientos fueron: 1) sustrato; 2) sustrato + HMA; 3) sustrato + S; 4) sustrato + HMA + S; 5) sustrato: RP; 6) sustrato: RP + HMA; 7) sustrato: RP + S, y 8) sustrato: RP + HMA + S. Se efectuaron 3 repeticiones por tratamiento. Los parámetros evaluados fueron el contenido de P total y asimilable en el sustrato, el P en el tejido vegetal y la biomasa seca. Todos ellos fueron significativamente mayores en

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mariasvelazquez@yahoo.com.ar (M.S. Velázquez).

KEYWORDS

P solubilizing fungi;
 P mobilizing fungi;
 Phosphate rock;
 Volcanic ashes

las plantas que crecieron en el sustrato adicionado con RP e inoculadas con S y HMA. Este trabajo confirma que la combinación S/HMA con cenizas volcánicas del Puyehue y las RP del Grupo Río Chico formuladas con un sustrato comercial promueven el crecimiento de *L. sativa*. De este modo es posible incrementar el valor agregado de geomateriales de origen nacional. © 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Combination of phosphorus solubilizing and mobilizing fungi with phosphate rocks and volcanic materials to promote plant growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Abstract Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase the uptake of soluble phosphates, while phosphorus solubilizing fungi (S) promote solubilization of insoluble phosphates complexes, favoring plant nutrition. Another alternative to maintaining crop productivity is to combine minerals and rocks that provide nutrients and other desirable properties. The aim of this work was to combine AMF and S with pyroclastic materials (ashes and pumices) from Puyehue volcano and phosphate rocks (PR) from Río Chico Group (Chubut) - to formulate a substrate for the production of potted *Lactuca sativa*. A mixture of Terrafertil®:ashes was used as substrate. *Penicillium thomii* was the solubilizing fungus and *Rhizophagus intraradices* spores (AMF) was the P mobilizer (AEGIS® Irriga). The treatments were: 1) Substrate; 2) Substrate + AMF; 3) Substrate + S; 4) Substrate + AMF + S; 5) Substrate: PR; 6) Substrate: PR + AMF; 7) Substrate: PR + S and 8) Substrate: PR + AMF + S. Three replicates were performed per treatment. All parameters evaluated (total and assimilable P content in substrate, P in plant tissue and plant dry biomass) were significantly higher in plants grown in substrate containing PR and inoculated with S and AMF. This work confirms that the combination of S/AMF with Puyehue volcanic ashes, PR from the Río Chico Group and a commercial substrate promote the growth of *L. sativa*, thus increasing the added value of national geomaterials.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y los microorganismos solubilizadores de fósforo (P) presentes en la rizósfera cumplen un importante papel en el crecimiento y desarrollo de sus plantas hospedadoras¹. Los HMA (*phylum* Glomeromycota) incrementan la toma de fosfatos solubles en los alrededores de la planta^{3,29}, mientras que los hongos solubilizadores de P (S) promueven la solubilización de complejos insolubles de fosfato^{1,7,8,13,34}. Este proceso se logra a través de la acidificación y la quelación, así como por reacciones de intercambio de iones y producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como glucónico, cítrico y oxálico^{5,31}.

Otra alternativa de uso para mantener la productividad de las plantas es la combinación de diferentes materiales minerales en el sustrato de crecimiento, que puedan aportar nutrientes, entre otras propiedades deseables. El P y el nitrógeno (N) son los nutrientes más importantes en el suelo que limitan el crecimiento vegetal. Se estima que 5,7 billones de hectáreas en el mundo no contienen la cantidad suficiente de P disponible para sustentar la productividad de sus cultivos¹⁵. Nuestro país no registra depósitos fosfóricos con altos contenidos de P como para elaborar fertilizantes fosfatados, no obstante, cuenta en distintas regiones con amplios depósitos de rocas fosfóricas (RP),

con contenidos bajos a medianos de este nutriente, que no permiten la elaboración de fertilizantes solubles (p. ej., superfosfatos) con las tecnologías actuales.

Los sistemas de cultivos sin suelo en Argentina son relativamente recientes. Han adquirido importancia y crecido en forma sostenida, especialmente en la última década. Estos sistemas requieren la utilización de sustratos³². Estos son materiales porosos que, colocados en contenedores, proporcionan anclaje y suficientes niveles de agua y oxígeno para el crecimiento de las plantas. Entre las ventajas que presentan los cultivos sin suelo se destacan la eliminación de patógenos, el ajustado control de la disponibilidad de nutrientes y la uniformidad en la producción. Por ello, este sistema se ha difundido rápidamente en la producción de plantines hortícolas, forestales, frutícolas, florícolas, de tabaco y de plantas ornamentales. Los cultivos sin suelo requieren de insumos tales como turba, perlita o arcillas expandidas, entre otros, en su mayor parte de alto costo. La incorporación de materiales piroclásticos (cenizas, pumicitas y otros materiales volcánicos) en sustratos es frecuente en otros países que disponen de ellos. Dado los amplios recursos de materiales volcánicos existentes en distintas regiones de nuestro país, resulta de interés ampliar las posibilidades de su uso agrícola, especialmente en cultivos intensivos, y reemplazar el uso de productos importados y de alto costo.

La erupción del complejo volcánico Puyehue-Cordón Caulle (junio del 2011) expulsó a la atmósfera grandes cantidades de materiales piroclásticos que cubrieron amplias extensiones de Argentina. En las provincias de Río Negro y Neuquén, las más afectadas, la acumulación de estos materiales cubrió 5.658 ha; en el 45% de esta superficie el espesor de cenizas alcanzó de 0,2 a 1,5 cm y en el 55% restante la acumulación fue mayor de 1,5 cm¹⁰.

Se han probado alternativas para el uso de estos materiales como sustratos de crecimiento de plantas, así también como vehículos o transportadores (*carriers*) de microorganismos beneficiosos. Estos materiales piroclásticos han sido probados por Barbaro et al.², quienes obtuvieron resultados alentadores al combinarlos con turba *Sphagnum* como sustrato de crecimiento de *Salvia splendens*. Por otro lado, Schalamuk et al.^{25,26} evaluaron la potencialidad de estos materiales como *carriers* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para su uso como micoinsecticida.

La aplicación directa de RP de baja ley en la agricultura puede ser tecnológicamente viable cuando se la combina con microorganismos beneficiosos, dada su capacidad de promover la solubilización y la movilización del P hacia la planta en algunos suelos²⁷.

Las RP del Grupo Río Chico (Chubut), de origen sedimentario, constituyen un recurso de interés como fuente de fósforo para la agricultura^{23,28}. Si bien estas RP son de bajo contenido de P, una alternativa económica y ecológica podría ser la aplicación directa de RP conjuntamente con microorganismos capaces de solubilizar el P mediante la producción de ácidos orgánicos¹². En tal sentido, estas fosforitas han sido probadas a través de la inoculación de sustratos con microorganismos^{4,33,34}. Los estudios biológicos realizados han demostrado que cepas nativas de geohongos como *Penicillium thomii* y *Aspergillus niger* solubilizan las RP mencionadas, lo que ha sido corroborado tanto en estudios *in vitro* en medios de cultivo como en sustratos para el crecimiento vegetal. Por otra parte, se ha encontrado que la aplicación de dichas RP junto con los S mencionados y HMA generó respuestas positivas en el crecimiento de especies hortícolas³¹.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue combinar HMA y S con materiales geológicos argentinos —cenizas y pumicitas procedentes del volcán Puyehue y RP del Grupo Río Chico— en la elaboración de un sustrato para la producción en maceta de plantas de *Lactuca sativa*.

Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo en condiciones controladas en el invernáculo perteneciente al Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Preparación y características del sustrato

Para formular el sustrato se utilizó una mezcla del producto comercial Terrafertil® (Terrafertil Sociedad Anónima Moreno, Provincia de Buenos Aires, Argentina) con cenizas (1:1 v/v). Las cenizas provinieron de Neuquén, Villa La Angostura (40° 45' 48" S; 71° 38' 46" O); sus propiedades

Tabla 1 Propiedades físicas y químicas de las cenizas utilizadas para mezclar con el producto comercial y emplear como sustrato de crecimiento de plantas de *Lactuca sativa*

Propiedades	Cenizas
pH	5,18
Conductividad eléctrica (dS/m)	0,01
Calcio (mg/l)	5
Magnesio (mg/l)	3
Potasio (mg/l)	9
Sodio (mg/l)	90
Densidad aparente (kg/cm ³)	474
Poros con aire (%)	44
Capacidad de retención de agua (%)	39
Espacio poroso total (%)	83
Partículas > 3,35 mm (%)	0
Partículas 3,35-1 mm (%)	38
Partículas < 1 mm (%)	62

físicas y químicas se muestran en la tabla 1. Las cenizas fueron tamizadas con una malla de 2 mm antes de mezclarlas con el sustrato comercial. El sustrato fue tinalizado antes de disponerlo en macetas de 377 cm³ para el ensayo en invernáculo. El pH en pasta de la mezcla Terrafertil®-ceniza, determinado a 23,7°C, fue de 5,7.

A la mitad del sustrato así obtenido se le adicionó como fuente de fósforo RP provenientes del Grupo Río Chico. La cantidad de RP adicionada al sustrato fue calculada para proveer como suplemento nutricional fosforado 22,7 mg de RP por planta.

Estudios químicos y mineralógicos de las rocas fosfóricas

Las RP fueron analizadas mediante difracción de rayos X (Goniómetro Philips 3020 con controlador PW 3710, radiación Cu-K α y filtro de Ni). Se efectuaron análisis cuantitativos mediante ICP-AES (ALS Chemex Lab, Canadá) y por fotometría infrarroja (FT-IR). Se calculó la relación molar CO₃/PO₄¹⁷. También se determinó la solubilidad de la RP mediante el empleo de diferentes extractantes⁶.

Inoculación con hongos solubilizadores de fósforo (S) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA)

Como S se usó una cepa de *P. thomii* depositada en el Instituto Spegazzini, La Plata (LPS cultivo n.º 743), aislada de un suelo de Tierra del Fuego, Argentina²¹. Para el aislamiento, la identificación, la determinación de la capacidad solubilizadora de P y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se siguió la metodología descrita por Cabello et al.⁴. Se adicionaron 5 g del inóculo de *P. thomii* con una concentración de 10⁷ células/ml.

Para la inoculación con HMA, se utilizó el fertilizante biológico AEGIS® Irriga (N.º de lote: ASIR311HL, Grupo Giten, Tarragona, España), el cual contenía esporas de HMA. El producto fue analizado en el Instituto Spegazzini mediante la técnica de tamizado y centrifugación en gradiente de

sacarosa³³. Se determinó que contenía 192 esporas/g de inoculante y el morfotipo de aquellas correspondía a *Rhizopogon intraradices* (Schenck & Smith) Walker & Schuessler. Este inóculo fue mezclado con el sustrato de crecimiento, siguiendo la dosificación indicada en el marbete, de modo que cada planta recibió 3 g de inoculante. Cuando finalizó el ensayo, los sistemas radicales fueron cuidadosamente lavados, clarificados y teñidos de acuerdo a la técnica de Phillips y Hayman²². Se procedió al recuento de segmentos de raíz micorrizados en microscopio, según McGonigle et al.¹⁶.

Ensayo con plantas

El ensayo consistió en 8 tratamientos (3 macetas por tratamiento): 1) sustrato (control sin RP); 2) sustrato+HMA; 3) sustrato+S; 4) sustrato+HMA+S; 5) sustrato: RP (control con RP); 6) sustrato: RP+HMA; 7) sustrato: RP+S, y 8) sustrato: RP+HMA+S.

Las semillas de *L. sativa* fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (10% v/v) durante 10 min, y luego enjuagadas con agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas en un sustrato estéril compuesto de perlita:vermiculita (1:1 v/v), colocadas en bandejas plásticas de 20 × 15 × 5 cm. Luego de la germinación, a los 15 días, las plántulas fueron seleccionadas por uniformidad de tamaño y trasplantadas según se detalla a continuación.

La unidad experimental fue una maceta (10 × 12 cm, 377 cm³). Cada maceta se llenó con 315 g del sustrato correspondiente y se trasplantó una plántula de *L. sativa* pregerminada, como se mencionó anteriormente. Las macetas se dispusieron en un invernáculo con temperatura controlada (24 ± 1 °C día/20 ± 1 °C noche) y un fotoperíodo de 16 h proporcionado por lámparas blancas-frías e incandescentes. El ensayo finalizó a los 60 días. En ese momento, se midió la masa seca y fresca de la parte aérea y radical.

Análisis del contenido de P

El contenido de P total y asimilable en el sustrato y el contenido de P en el tejido vegetal se determinó según las normas estandarizadas por la Comisión de Normalización y Acreditación —Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo—, métodos de análisis de tejidos vegetales (revisión 2004). Los análisis se realizaron en un laboratorio Habilitado OPDS, Reg. N.º 017 Res. 640/02.

Diseño experimental y análisis estadísticos

Los datos obtenidos de P total y asimilable en el sustrato, de P en el tejido vegetal, de peso seco aéreo y radical, de colonización radical por HMA y de UFC de *P. thomii* fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando un diseño completamente aleatorizado. El porcentaje de colonización fue transformado utilizando $\arcsen\sqrt{x}$ y los de UFC aplicando $\log(x+1)$, para ajustar los datos a una distribución normal y normalizar los residuos de la varianza. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey. Se consideró $p < 0,05$ como valor de significación estadística. El software utilizado fue el programa InfoStat versión 2009⁹.

Resultados

Estudios químicos y mineralógicos de la roca fosfórica

Los análisis de la RP mediante difracción de rayos X registraron reflexiones principales de fosfatos pertenecientes a carbonatohidroxilapatita (2,78; 2,68; 1,96 Å) y a carbonatofluorapatita (2,69; 2,79; 2,24; 3,05 Å); se identificaron además calcita, cuarzo y caolinita. Los análisis cuantitativos mediante ICP-AES revelaron los elementos principales expresados en óxidos (tabla 2). El espectro FT-IR de las fosforitas mostró las bandas de absorción bien definidas del enlace C-O a 1.427 y 1.456/cm. Además, se destacaron las bandas de 603 y 578/cm, correspondientes al enlace P-O, las cuales son características de las carbonato-apatitas. La relación molar CO₃/PO₄ permitió establecer que el componente fosfórico posee un elevado reemplazo isomórfico de PO₄⁻³ por CO₃⁻², con valores del 18%.

Fósforo total y asimilable en el sustrato

En la figura 1 se observan los contenidos de P total y P asimilable en el sustrato de crecimiento de plantas de *L. sativa*.

Los contenidos de P total en el sustrato (fig. 1A) no mostraron diferencias significativas en los tratamientos inoculados con HMA, con S o con HMA+S ($F = 3,15$; $gl = 3$; $p = 0,0542$). Cuando se analizó el efecto de la adición de RP, se observaron diferencias significativas ($F = 6,75$; $gl = 1$; $p < 0,05$), con valores más altos en los tratamientos con RP con respecto a aquellos en los que no se adicionó RP (464,15 μg/g y 388,03 μg/g de P total, respectivamente). La interacción microorganismos × RP presentó diferencias significativas ($F = 7$; $gl = 0,59$; $p < 0,05$). El tratamiento con RP+S+HMA fue el que mostró el mayor contenido de P total en el sustrato (569,5 μg/g), mientras que el control sin RP mostró el menor contenido (355 μg/g).

En la figura 1B se observan los contenidos de P asimilable en el sustrato. Los tratamientos inoculados con microorganismos y en los que se adicionó RP presentaron diferencias significativas ($F = 4,63$; $gl = 3$; $p < 0,05$ y $F = 5,27$; $gl = 1$; $p < 0,05$, respectivamente). Con la inoculación con HMA+S se obtuvieron los valores más altos de P asimilable (110,86 μg/g), mientras que los valores más bajos (57,46 μg/g) se registraron en el tratamiento con HMA. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($F = 0,7$; $gl = 7$; $p = 0,0675$) en la interacción microorganismo × RP.

Fósforo en el tejido vegetal

El contenido de P en el tejido vegetal se observa en la figura 2. La presencia de microorganismos llevó a diferencias significativas en este nutriente ($F = 3,98$; $gl = 3$; $p < 0,05$), el mayor contenido se registró en el tratamiento con HMA+S (4.952,83 μg/g), mientras que el menor en el tratamiento con HMA (3.913,83 μg/g). La adición de RP en el sustrato llevó a diferencias significativas ($F = 5,71$; $gl = 1$; $p < 0,05$): el mayor contenido se verificó en el tratamiento con RP (4.639,58 μg/g) y el menor en el que no se adicionó

Tabla 2 Análisis cuantitativos (ICP-AES) de las rocas fosfórica de Río Chico en porcentaje de óxidos y valores de BPL (Bone Phosphate of Lime)

	P2O5	Al2O5	SiO2	Fe2O3	CaO	MgO	Na2O	K2O	F	Cl	CO2	SO3	TiO2	Corg	BPL
<i>Muestras</i>															
1	19,2	5,75	32,4	2,15	30,1	0,45	1,7	1,5	2,1	0,5	2,8	0,8	0,4	0,1	42,4
2	16,4	6,1	34,5	1,85	29,7	0,65	1,82	2,55	2,15	0,42	2,93	0,45	0,32	0,05	36,12

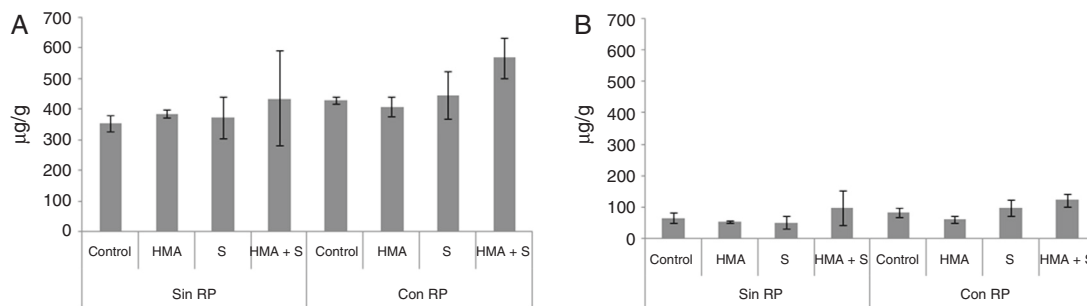


Figura 1 Concentración de fósforo en 2 sustratos de crecimiento de plantas de *Lactuca sativa*, constituidos por una mezcla de Terrafertil® con cenizas del volcán Puyehue, sin roca fosfórica (sin RP) o adicionada con roca fosfórica (con RP). A) Fósforo total. B) Fósforo asimilable. Los datos son promedio de 3 macetas. Las líneas sobre las barras indican desviación estándar del promedio. HMA: hongo micorrízico arbuscular; S: hongo solubilizador de fósforo.

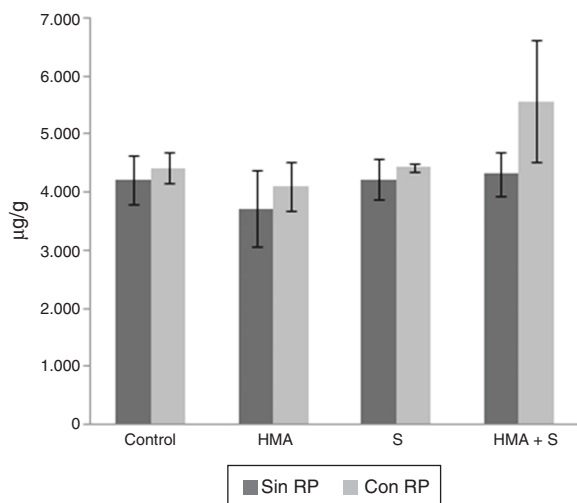


Figura 2 Fósforo en el tejido de plantas de *Lactuca sativa* cultivadas durante 60 días en 2 sustratos de crecimiento, constituidos por una mezcla de Terrafertil® con cenizas del volcán Puyehue, sin roca fosfórica (Sin RP, serie gris oscuro) o adicionada con roca fosfórica (Con RP, serie gris claro). Líneas sobre las barras indican una desviación estándar de los promedios de 3 repeticiones. HMA: hongo micorrízico arbuscular; S: hongo solubilizador de fósforo.

esta fuente (4.126,67 µg/g). La interacción microorganismos × RP fue significativamente diferente (F = 1,33; gl = 7; p < 0,05), observándose los mayores contenidos de P en el tratamiento HMA + S × RP y el menor en el tratamiento solo con HMA (5.575,33 µg/g y 3.720,62 µg/g, respectivamente).

El contenido de P en el tejido vegetal fue significativamente mayor en las plantas que crecieron en el sustrato con RP en comparación con las que crecieron sin adición de RP. El contenido de P en las plantas que se desarrollaron en sustrato combinado con RP fue significativamente mayor en el tratamiento en el que se incorporaron HMA y S (5.575 µg/g) y un valor significativamente menor se registró en el tratamiento asociado a HMA (4.107 µg/g). La misma tendencia se observó en las plantas que crecieron en el sustrato, al cual no se le adicionó RP: el mayor contenido de P se observó en aquellas en las que estuvieron consociados HMA y S (4.225 µg/g) y valores significativamente menores (3.720 µg/g) se registraron en las que solo se inocularon con HMA.

Evaluación de los parámetros de crecimiento de las plantas de *L. sativa*

La figura 3 muestra los resultados obtenidos de biomasa seca aérea y radical de las plantas de *L. sativa*.

La biomasa seca aérea (fig. 3A) mostró diferencias significativas cuando se analiza el efecto simple de la presencia de microorganismos (F = 11,61; gl = 3; p < 0,05). El mayor valor se registró en el tratamiento HMA + S (1,27 g), mientras que el menor fue en el tratamiento control (0,41 g). Al analizar el efecto de la RP, fueron registrados valores significativamente mayores (F = 18,1; gl = 1; p < 0,05) en los tratamientos con RP y menores en los cuales no se adicionó RP (1,06 g y 0,58 g, respectivamente). Para la interacción microorganismos × RP las diferencias fueron significativas (F = 2,86; gl = 7; p < 0,05); la mayor biomasa aérea se registró en el tratamiento HMA + S × RP y la menor en el control sin RP (1,69 g y 0,3 g, respectivamente).

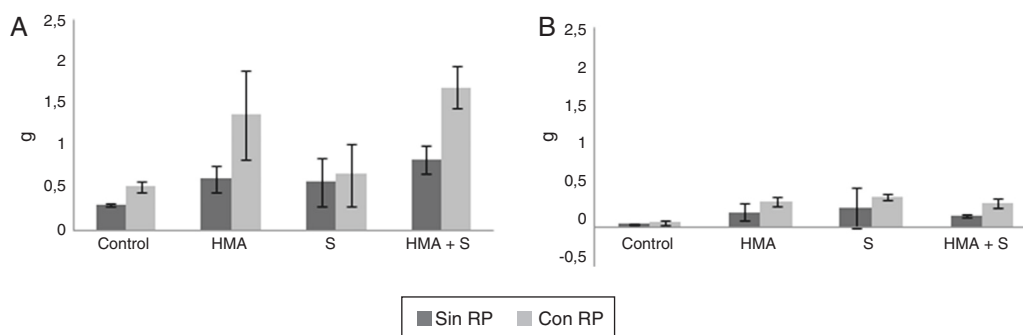


Figura 3 Peso seco aéreo (A) y radical (B) de plantas de *Lactuca sativa* cultivadas durante 60 días en 2 sustratos de crecimiento, constituidos por una mezcla de Terrafertil® con cenizas del volcán Puyehue, sin roca fosfórica (Sin RP, serie gris oscuro) o adicionada con roca fosfórica (Con RP, serie gris claro). Las líneas sobre las barras indican una desviación estándar del promedio de 3 repeticiones. (HMA) Hongo micorrízico arbuscular; (S) Hongo solubilizador de fósforo.

La biomasa seca radical (fig. 3B) solo mostró diferencias significativas ($F = 3,92$; $gl = 3$; $p < 0,05$) al analizar el efecto simple de los tratamientos con microorganismos; el mayor valor se observó cuando se inoculó con HMA y el menor en el tratamiento control (0,25 g y 0,05 g, respectivamente). La presencia de RP ($F = 0,58$; $gl = 1$; $p = 0,45$) y la interacción microorganismos \times RP ($F = 2,74$; $gl = 7$ y $p = 0,07$) no mostraron diferencias significativas.

Colonización radical por hongos formadores de micorrizas arbusculares

Las estructuras observadas fueron micelio externo, micelio interno, puntos de entrada y arbusculos (tabla 3). Se comprobó la presencia de estructuras pertenecientes a HMA solo en los tratamientos inoculados con micorrizas arbusculares. La cantidad de arbusculos fue el único parámetro micorrízico que presentó diferencias significativas entre el tratamiento inoculado solo con HMA y aquellos en los que se encontraban HMA + S. El mayor porcentaje de colonización con arbusculos (26%) fue observado en el tratamiento con RP y ambos microorganismos (HMA + S), mientras que un valor significativamente menor se observó en el tratamiento sin RP y micorrizas (4%).

Los porcentajes de colonización con la presencia de micelio tanto externo como interno presentaron la misma tendencia: los mayores porcentajes fueron encontrados en el tratamiento sin RP y con la presencia de ambos

microorganismos (50% con micelio externo y 52% con micelio interno), y los valores más bajos se encontraron en el tratamiento sin RP y con HMA (21% y 20% con micelio externo e interno, respectivamente). Con respecto al porcentaje de puntos de entrada, el mayor valor se obtuvo en aquellos tratamientos en los que se adicionó RP + HMA (31%) y el menor valor se reportó en el tratamiento sin RP y con los 2 tipos de microorganismos consociados (7,3%).

Unidades formadoras de colonia de hongos solubilizadores de P

Se encontraron diferencias significativas para el recuento de UFC de *P. thomii* al analizar el efecto simple de la adición de RP y la presencia de microorganismos. La interacción microorganismo \times RP no mostró diferencias significativas (tabla 3). El recuento más alto de estos microorganismos se obtuvo en el tratamiento HMA + S (1,43 UFC/g de sustrato) y el más bajo en el que estaban solo presentes los solubilizadores (1,31 UFC/g de sustrato). Considerando la adición de RP, en el tratamiento sin RP se obtuvo un mayor recuento que en el que recibió RP (1,51 UFC/g de sustrato y 1,23 UFC/g de sustrato, respectivamente).

Discusión

Las cenizas volcánicas provenientes del volcán Puyehue presentaron propiedades físico-químicas favorables para su uso

Tabla 3 Resultados del ANOVA de 2 vías (valores de F y P) para el efecto de la adición de roca fosfórica, la presencia de microorganismos y la interacción entre ambos factores sobre las variables de colonización por hongos formadores de micorrizas arbusculares y las unidades formadoras de colonias de hongos solubilizadores de fósforo

	Micelio externo		Micelio interno		Punto de entrada		Arbusculos		Unidades formadoras de colonias	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Roca fosfórica	0,04	0,84	0,11	0,75	4,21	0,07	0,19	0,67	74,09	< 0,01
Presencia de microorganismos	2,92	0,12	2,62	0,14	0,77	0,41	5,90	<0,05	13,15	< 0,01
Roca fosfórica \times microorganismos	0,41	0,54	1,02	0,34	0,15	0,71	0,11	0,75	1,69	0,22

Nivel de significancia $p < 0,05$.

como sustrato en cultivos en maceta. No obstante, se plantea la necesidad de combinarlas con otros materiales para optimizar sus propiedades. Barbaro et al.² destacaron que estos materiales piroclásticos en combinación con sustrato como turba *Sphagnum* aumentan la capacidad de retención de agua, al mejorar la relación de poros con aire y agua.

Los contenidos de P total y asimilable en el sustrato aumentaron en aquellos tratamientos en los que se adicionó RP y se los combinó con *P. thomii* y *R. intraradices*. Esto evidencia las posibilidades que presentan las RP del Grupo Río Chico para ser utilizadas en aplicación directa en contenedores. Si bien las RP utilizadas en este ensayo presentan bajos contenidos de P, constituyen una alternativa económica y ecológica en combinación con microorganismos capaces de solubilizar fosfato, como *P. thomii*, y con movilizadores de este elemento, como en el caso del hongo arbuscular *R. intraradices*. Las interacciones que ocurren entre estos microorganismos son esenciales para entender la dinámica de procesos que acontecen en la rizósfera³⁰. De este modo, un gran número de microorganismos rizosféricos desarrollan actividades que alteran la disponibilidad de nutrientes y actúan sinérgicamente con HMA para incrementar el crecimiento de las plantas^{1,7,8,18,19}.

Asimismo, el mayor contenido de P en el tejido vegetal se registró en aquellas plantas en las que se combinaron las cenizas del volcán Puyehue, la RP y el consorcio S/HMA. Goenadi et al.¹¹ reportaron una mejor absorción tanto del P nativo como del P contenido en las RP cuando las plantas son coinoculadas con ambos microorganismos. La capacidad solubilizadora de *P. thomii* y el sinergismo positivo de este hongo con *Funneliformis mosseae*, un HMA, en el crecimiento de plantas de *Mentha piperita* fueron comprobados por Cabello et al.⁴.

Los parámetros de crecimiento de la planta, medidos como biomasa aérea seca, fueron mayores en aquellas plantas con la adición de RP sumada a la inoculación de *P. thomii* y *R. intraradices*. Estos resultados coinciden con los incrementos de P detectados en el tejido vegetal de estas plantas. El aumento de biomasa aérea puede atribuirse tanto a una mejor nutrición fosforada como al efecto de la coinoculación con microorganismos. El efecto positivo con el tratamiento coinoculado abarcó, además, al tratamiento sin RP y con *P. thomii/R. intraradices*, que presentó el mayor peso seco aéreo. Este resultado evidencia que el sinergismo entre estos microorganismos resultó beneficioso para la producción de biomasa de *L. sativa*, aun bajo esta condición. Velázquez et al.³¹ también reportaron un incremento en la biomasa de plantas de tomate cuando fueron coinoculadas con *A. niger/F. mosseae*, tanto en sustratos que recibieron aportes de una fuente fosforada como aquellos sustratos que no los recibieron.

En cuanto a la producción de biomasa seca radical, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con agregado de RP o sin él. Sin embargo, las plantas asociadas con HMA presentaron el mayor valor de biomasa radical en ambas condiciones (con RP y sin RP), mientras que el menor peso seco se encontró en los tratamientos de control. El incremento de la biomasa radical por efecto de la inoculación con *R. intraradices* ha sido previamente reportado por Salgado-Barreiro et al.²⁴. El aumento en la producción de la biomasa radical, así como de la biomasa aérea, es parte de

la respuesta positiva que la planta hospedadora obtiene de la simbiosis micorrícica. En nuestro trabajo, este aumento de biomasa radical es un efecto positivo de la colonización por hongos arbusculares y fue independiente de la adición de una fuente fosforada.

Todas las plantas que recibieron inóculo a base de HMA evidenciaron en sus raíces estructuras características de esta asociación: micelio externo e interno, puntos de entrada y arbusculos. Sin embargo, el número de arbusculos mostró diferencias significativas entre los tratamientos: se observó la mayor cantidad de arbusculos en los tratamientos con RP y con los microorganismos consociados. En nuestro trabajo se observa que la cantidad de P, tanto total como asimilable en el sustrato, se relaciona de manera positiva con un aumento en la colonización arbuscular. Estas observaciones contrastan con los hallazgos de otros autores, que señalan una correlación negativa entre disponibilidad de P y la colonización micorrícica²⁸. Velázquez et al.³¹ encontraron que los porcentajes de colonización radical disminuían en los tratamientos coinoculados y con la adición de RP.

Los resultados aportados en este ensayo confirman la capacidad solubilizadora de *P. thomii* frente a una fuente de P insoluble, dato reportado previamente por Cabello et al.⁴. Kucey et al.¹⁵ y Kapoor¹⁴ describieron que la excreción de ácidos orgánicos y sustancias quelantes son las vías por las cuales los microorganismos solubilizadores disuelven estas formas no disponibles de P. Los valores de UFC de *P. thomii* obtenidos en los recuentos estuvieron influenciados por la adición de RP y por los microorganismos. Los tratamientos en los cuales se adicionó RP evidenciaron los menores recuentos, en relación con los tratamientos sin RP. La liberación de ácidos orgánicos producidos durante el proceso de solubilización disminuye el pH del sustrato²⁰. Posiblemente, este incremento en la acidez afecte a la germinación de las esporas de *P. thomii*. De este modo, el tratamiento con RP y el consorcio *P. thomii* y *R. intraradices* presentó los valores más elevados de P soluble. En relación con la presencia de microorganismos, los tratamientos coinoculados, adicionados o no con RP, presentaron los mayores recuentos, lo que resalta el sinergismo positivo entre ambos microorganismos. Estos efectos sinérgicos han sido reportados en trabajos previos^{3,4}.

Este trabajo confirma que las cenizas volcánicas del volcán Puyehue y las rocas fosfóricas del grupo Río Chico, formuladas con un sustrato comercial (Terrafertil®) y con la combinación de microorganismos solubilizadores/movilizadores de P, representan una alternativa favorable para el reemplazo parcial de los materiales convencionales (perlita, turba, arcillas expandidas, entre otros) usados en el cultivo de plantas de *L. sativa* en maceta. De este modo, se incrementa también el valor agregado de materiales geológicos de origen nacional.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración del Instituto de Recursos Minerales (INREMI-UNLP-CIC).

Bibliografía

- Arrieta AM, Iannone LJ, Scervino JM, Vignale MV, Novas MV. A foliar endophyte increases the diversity of phosphorus-solubilizing rhizospheric fungi and mycorrhizal colonization in the wild grass *Bromus auleticus*. *Fungal Ecol.* 2015;17:146–54.
- Barbaro LA, Mazzoni A, Karlanian MA, Fernandez MN, Morisigue DE. Cenizas del volcán Puyehue como sustrato para plantas. *Floricultura.* 2014;81:44–53.
- Buscot F, Varma A. En: Varma AJ, Buscot F, editores. *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p. 419.
- Cabello M, Irrazabal G, Bucsinszky AM, Saparrat M, Schalamuk S. Effect of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, and a rock-phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium thomii*, on *Mentha piperita* growth in a soilless medium. *J Basic Microbiol.* 2005;45:182–9.
- Chalharn M, Lumyong S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25:305–14.
- Chien SH, Hammond LL. A comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate rocks for direct application. *Soil Sci Soc Am J.* 1978;42:935–9.
- Della Monica IF, Saparrat MCN, Godeas AM, Scervino JM. Th coexistence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecol.* 2015;17:10–7.
- Della Monica IF, Stefanoni Rubio PJ, Cina RP, Recchi M, Godeas AM, Scervino JM. Effects of the phosphate-solubilizing fungal *Talaromyces flavus* on the development an efficiency of the *Gigaspora rosea-Triticum aestivum* symbiosis. *Symbiosis.* 2014;64:25–32.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat versión Grupo InfoStat FCA.* Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2009.
- Gaitán J, Raffo F, Ayesa J, Umaña F, Bran D. Zonificación del área afectada por cenizas volcánicas en Río Negro y Neuquén. En: INTA, editor. *Presencia.* N. °57. Bariloche: Publicaciones regionales; 2011. p. 4-7.
- Goenadi DH, Siswanto S, Sugiarto Y. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with phosphorus solubilizing fungus of soil. *Soil Sci Soc Am J.* 2000;64:927–32.
- Gyaneshwar P, Naresh Kumad G, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. En: Adu-Gyamfi JJ, editor. *Food security in nutrient-stressed environments: Exploiting plants genetic, capabilities.* Andra Pradesh: Kluwer Academic Publishers; 2002. p. 1–3.
- Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes a review. *Plant Soil.* 2001;237:173–95.
- Kapoor KK. Phosphate mobilization through soil microorganism. En: Behl RK, Khurama AL, Dougra RC, editores. *Plant microbe interaction in sustainable agricultura.* New Delhi, India: CCS Haryana Agricultural University, Hisar and MMB; 1995. p. 46–61.
- Kucey RMN, Janzen HH, Leggett ME. Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Adv Agron.* 1989;42:199–228.
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 1990;115:495–501.
- McLellan GH, Gremillion LR. Evaluation of phosphatic raw materials. En: Gremillion LR, editor. *The role of phosphorus in agriculture.* Madison: Estados Unidos; 1980. p. 43–80.
- Osorio NW, Habte M. Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and growth of plants in the soils of the tropics. En: Khan MS, Saidi M, Musarrat A, editores. *Microbial strategies for crop improvement.* Berlin: Springer; 2009. p. 325–51.
- Osorio NW, Habte M. Synergistic effect of a phosphate solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on *Leucaena* seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany.* 2013;91:274–81.
- Pal Saha S, Bhattacharyya S, Chakraborty H. Solubilization of tricalcium phosphate by P(3HB) accumulating *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;30:1575–82.
- Pancotto VA, Sala OE, Cabello MN, López NI, Robson TM, Ballaré CL, Caldwell MM, Scopel AL. Solar UV-B decreases decomposition in herbaceous plant litter in Tierra del Fuego, Argentina, potential role of an altered decomposer community. *Global Change Biol.* 2003;9:1465–74.
- Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasite and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc.* 1970;55:158–60.
- Raigemborn MS, Krause JM, Bellosi E, Matheos SD. Redefinición estratigráfica del grupo Río Chico (Paleógeno Inferior) en el norte de la cuenca del golfo San Jorge Chubut. *Rev Asoc Geol Argent.* 2010;67:239–56.
- Salgado-Barreiro CS, Bravo-Patiño A, Wang ET, Cárdenas-Navarro R. Efecto de la inoculación con *Glomus intraradices* y de la fertilización nitrogenada en el crecimiento de plantas de fresa. *Sci Agrop.* 2012;2:171–9.
- Schalamuk S, Pelliza S, Scorsetti AC, Gonzalez MJ, Botto IL. Cenizas volcánicas del complejo Puyehue-Cordón Caulle, como vehículo de conidios de *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales): potencialidad como bio-insecticida. XIII Congreso Argentino de Microbiología, 2013.
- Schalamuk S, Pelliza S, Scorsetti AC, Gonzalez MJ, Botto IL. Pyroclastic material from the Puyehue-Cordon-Caulle Volcanic Complex Chile as carrier of *Beauveria bassiana* conidia potential utilization in mycoinsecticide formulations. *J Agric Chem Environ.* 2014;3:14–21.
- Schalamuk S, Otero JI, Sy V, Velazquez S., Rocas fosfóricas del Grupo Río Chico (Chubut): alternativas para su aplicación directa. XIV Reunión Argentina de Sedimentología. Puerto Madryn, 2014.
- Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal dimbiosis.* London, UK: Academia Press; 2008.
- Tripura CB, Sashidhar B, Podile AR. Transgenic mineral phosphate solubilizing bacteria for improved agricultural

- productivity. En: Satyanarayana T, Johri BN, editores. *Microbial diversity current perspectives and potential applications*. New Delhi, India: I. K. International; 2005. p. 375–92.
30. Velázquez MS, Cabello M. Mycobization as a biotechnological tool: A challenge. En: Thangadurai D, Busso CA, Hijri M, editores. *Micorrhizal biotechnology*. Nueva Delhi: CRC Press; 2010.
 31. Velázquez MS, Eliades L, Irrazabal G, Saparrat M, Cabello M. Micobización con *Glomus mosseae* y *Aspergillus niger* en plantas de *Lycopersicon esculentum*. *J Agric Technol*. 2005;1: 315–26.
 32. Vence LB. Disponibilidad de agua-aire en sustratos para plantas. *Cienc Suelo*. 2008;26:105–14.
 33. Walker C, Myze W, McNabb HS. Populations of *Endogonaceous fungi* at two populations in Cental Iowa. *Can J Bot*. 1982;60:2518–29.
 34. Whitelaw MA. Growth promotion of plants inoculated with phosphate —solubilising fungi. *Adv Agron*. 2000;69:100–53.