



FACULTAD DE AGRONOMÍA – UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
ESCUELA PARA GRADUADOS ING. AGR. ALBERTO SORIANO

TESIS PARA OPTAR A LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL SUELO

TÍTULO:

**UTILIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS (DSE) EN LA
SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS EN SUELOS CON DISTINTAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS**

Tesista:

- Lic. Osvaldo L. Barresi

Director:

- Dra. Viviana M. Chiochio

Co-director:

- Ing. Agr. Raúl S. Lavado

Consejero:

- Dr. Federico N. Spagnoletti

Marzo – 2020

COMITÉ CONSEJERO

Directora de Tesis

Viviana Monica Chiocchio

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director de Tesis

Raúl Silvio Lavado

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Federico Nicolás Spagnoletti

Licenciado en Ciencias Ambientales (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agrarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Olga Susana Heredia

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister en Ciencias del Suelo (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agrarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Mario Carlos Nazareno Saparrat

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Naturales (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

Cecilia Cristina Carmarán

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 10 de Marzo de 2020

DEDICATORIA

A mis Padres.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a la Dra. Viviana Chiocchio, al Ing. Agr. Raúl Lavado y al Dr. Federico Spagnoletti por ayudarme a dar los primeros pasos en la actividad académica.

A la MSc. Lic. María Marta Caffaro y el Lic. Fernando Ureta por el apoyo técnico durante el desarrollo de los ensayos.

Al Ing. Agr. Federico Gómez y el Lic. Marcos Orellana por el apoyo durante el desarrollo de la tesis.

Finalmente, a todos los investigadores de las cátedras de microbiología agrícola y fertilidad y fertilizantes.

¡Muchas gracias!

DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

1. Barresi, O., Chiocchio, V.M., Lavado, R.S. 2018. Changes in soil phosphorus fractions caused by cropping without nutrient reposition. A case study. *Phyton: International Journal of Experimental Botany*, 87:14-17.
2. Barresi, O., Chiocchio, V.M., Lavado, R.S. 2019. Solubilización de fosfatos de un suelo alcalino por hongos endófitos septados oscuros (DSE) y respuesta de *Sorghum bicolor*. *Actas VI Congreso RAS*, 289.

INDICE GENERAL

CAPITULO 1	16
Introducción y antecedentes	16
1.1 El fósforo en el suelo	17
1.2. El fósforo orgánico	18
1.3 El fósforo inorgánico	19
1.4 Uso de microorganismos en el manejo del P.....	20
1.5 Hongos endófitos septados oscuros (DSE)	22
1.6 Molisoles y cultivo de sorgo de la Región Pampeana.....	23
Justificación.....	24
Objetivo General	25
CAPITULO 2	26
2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y Métodos	29
2.3 Resultados	33
2.4_Discusión	34
2.5 Conclusiones preliminares	34
CAPITULO 3	36
3.1. Introducción.....	37
3.2 Materiales y Métodos	39
3.3 Resultados	41
3.4 Discusión	43
3.5 Conclusiones preliminares	48
CAPITULO 4	49
4.1. Introducción.....	50
4.2 Materiales y Métodos	51
4.3 Resultados	56
4.4 Discusión	61
4.5 Conclusiones preliminares	65
CAPITULO 5	67
CONCLUSION FINAL	67
BIBLIOGRAFIA.....	70
ANEXO.....	82

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Características del perfil representativo del Hapludol serie Junín (INTA 2018).	30
Cuadro 2.2: Concentraciones registradas en las fracciones de P del suelo, en mg/kg	33
Cuadro 3.1: Hongos DSE aislados e identificados con potencial actividad solubilizadora de fosfatos inorgánicos.	39
Cuadro 3.2: Cambios en las distintas fracciones de P expresado en mg/kg, luego de 20 días de crecimiento de los hongos. Suelo con larga historia agrícola	2
Cuadro 3.3: Cambios en las distintas fracciones de P expresado en mg/kg, luego de 20 días de crecimiento de los hongos. Suelo con corta historia agrícola.	43
Cuadro 4.1: Características del perfil representativo del Natracualf integrante de la serie Rancagua (INTA 2018).....	54
Cuadro 4.2: Características analíticas ¹ de los dos suelos estudiados.....	57
Cuadro 4.3: Biomasa aérea en g/maceta (MS) obtenida luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido.....	60
Cuadro 4.4: Biomasa radical en g/maceta (MS) obtenida luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido.....	60
Cuadro 4.5: Concentración de P en la biomasa aérea en g/kg luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido.....	60
Cuadro 4.6: Concentración de P en la biomasa radical en g/kg luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido.....	61
Cuadro 4.7: Longitud radical en cm obtenida luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido	61
Cuadro 4.8: Biomasa aérea en g/maceta (MS) luego de 70 días de crecimiento en un sustrato con el suelo alcalino	61
Cuadro 4.9: Biomasa radical en g/maceta (MS) luego de 70 días de crecimiento en un sustrato con el suelo alcalino	61

Cuadro 4.10: Contenido de P en la biomasa aérea en g/kg luego de 70 días de crecimiento en un sustrato con suelo alcalino.....	62
Cuadro 4.11: Contenido de P en la biomasa radical en g/kg luego de 70 días de crecimiento en un sustrato con suelo alcalino.....	62
Cuadro 4.12: Longitud radical en cm luego de 70 días de crecimiento en un sustrato con suelo alcalino.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 2.1 Esquema del fraccionamiento de P inorgánico para suelos no calcáreos.....	32
Figura 2.2. Modificaciones en la proporción de las fracciones de P orgánico y demás fracciones de P inorgánico para suelos prístino y cultivado.....	33
Figura 3.1: Preparación de microcosmos.....	40
Figura 3.2: Efecto de los hongos DSE sobre las fracciones de P inorgánico del suelo con corta historia expresados en porcentaje.....	45
Figura 3.3: Efecto de los hongos DSE sobre las fracciones del P inorgánico del suelo con larga historia expresados en porcentaje.....	45
Figura 3.4: Efecto de los hongos DSE sobre la fracción de P residual en el suelo con larga historia.....	46
Figura 3.5: Efecto de los hongos DSE sobre la fracción de P residual en un suelo con corta historia.....	46
Figura 4.1: Esquema de preparación de cada speedling para la siembra del sorgo.....	52
Figura 4.2: Esquema de preparación de macetas para el crecimiento de sorgo.....	54
Figura 4.3: Boxplot de la biomasa aérea vs diferentes cepas de hongos en un sustrato conteniendo el suelo ácido.....	56
Figura 4.4: Boxplot de la biomasa aérea vs diferentes cepas de hongos en un sustrato con suelo alcalino.....	58

ABREVIATURAS

12-13: *Ophiosphaerella herpotricha*

13-5: *Alternaria alternata*

15-2: *Ophiosphaerella* sp.

Al: Aluminio

AEM: Agar extracto de malta

ANOVA: Análisis de varianza

C: Carbono

Ca: Calcio

C.E.: Conductividad eléctrica

CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico

CO: Carbono orgánico

DSE: Endófitos Septados Oscuros (del inglés Dark Septate Endophytes)

Fe: Hierro

G1B: *Curvularia* sp.

GR1A: *Setosphaeria rostrata*

H: Hidrógeno

HC: Hongo comercial

H₂O: Agua

K: Potasio

Mg: Magnesio

M.O.: Materia orgánica

N: Nitrógeno

Na: Sodio

Nt: Nitrógeno total

P: Fósforo

P Residual: Fracción del fósforo residual

P Soluble: Fósforo Soluble

P6: *Drechslera* sp.

P-Al: Fracción del fósforo ligada al aluminio

P-Ca: Fracción del fósforo ligada al calcio

P-Fe: Fracción del fósforo ligada al hierro

Pi: Fósforo inorgánico

Po: Fósforo orgánico

RESUMEN

En la región pampeana, el P posee disponibilidad restringida debido al proceso de agotamiento que sufrió luego de años de agricultura sin reposición. Para satisfacer los requerimientos nutricionales, se aplican fertilizantes fosfatados que pueden presentar consecuencias indeseadas al medio ambiente. Para lograr una agricultura sustentable, se investigan la habilidad de diferentes microorganismos de proveer P a los cultivos. Entre estos se encuentran los hongos DSE.

Primeramente, se estudió los cambios en las fracciones del Pi de dos suelos en una situación puntual de la región pampeana, un Hapludol típico agriculturizado y otro prístino. El P-Ca disminuyó en términos absolutos y relativos y el P-Al y P-Fe aumentaron. Sin embargo, la proporción de estas últimas fracciones fue afectada por cambios en el Po y P-Res. Si el presente hallazgo pudiera ser generalizado, indicaría una modificación de las fracciones de P para los suelos agriculturizados de la región.

En segundo lugar, se estudió el efecto de algunas cepas de hongos DSE sobre las fracciones del Pi en dos suelos con distintas historias de uso. Los hongos DSE presentaron diferente potencial para solubilizar las fracciones del Pi. El hongo *Setosphaeria rostrata* (G1A) tuvo el mejor rendimiento global, validando la hipótesis planteada.

En tercer lugar, se investigó los efectos de los DSE sobre la provisión de P al *Sorghum bicolor*, comparándolo con un hongo comercializado como solubilizador de fósforo y también, el efecto de la co-inoculación de los DSE con ese hongo comercial. Se trabajó con un suelo ácido y otro alcalino, en condiciones distintas de crecimiento (luz y temperatura) dadas por el invernáculo utilizado. El efecto de los hongos fue similar en los sustratos utilizados con ambos suelos. *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2) fueron los hongos que presentaron los mejores resultados.

Palabras clave: Fósforo, fraccionamiento del fósforo, solubilización, DSE, agricultura, suelo cultivado, suelo prístino, fracciones de P, co-inoculación.

ABSTRACT

In the Pampas region, the P has restricted availability due to the depletion process that it suffered after years of agriculture without replacement. To meet the nutritional requirements, phosphate fertilizers are applied, and may present undesirable consequences to the environment. To achieve sustainable agriculture, the ability of different microorganisms to provide P to crops are investigated. Among these are DSE fungi.

First, we studied the changes in the fractions of the P_i of two soils in a specific situation in the Pampas region, a typical agricultural and pristine Hapludoll. P-Ca decreased in absolute and relative terms and P-Al and P-Fe increased. However, the proportion of these latter fractions was affected by changes in the P_o and P-Res. If the present finding could be generalized, it would indicate a modification of the P fractions for agricultural soils in the region.

Secondly, the effect of some strains of DSE fungi on P_i fractions on two soils with different use histories were studied. DSE fungi presented different potential to solubilize the P_i fractions. The fungus *Setosphaeria rostrata* (G1A) had the best overall yield, validating the hypothesis.

Third, the effects of DSE on the provision of P to *Sorghum bicolor* were investigated, comparing it with a commercial fungus sold as phosphorus solubilizer and also, the effect of co-inoculation of DSE with that commercial fungus using an acidic and alkaline substrate, in different growing conditions (light and temperature) given by the greenhouse conditions. The effects of fungi were similar in both substrates. *Curvularia* sp. (G1B). and *Ophiosphaerella* sp. (15-2) were the fungi that presented the best results.

Key words: Phosphorus, phosphorus fractionation, solubilization, DSE, agriculture, cultivated soil, pristine soil, P fractions, co-inoculation.

CAPITULO 1

Introducción y antecedentes

1.1 El fósforo en el suelo

El fósforo (P) es uno de los elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas que, como consecuencia de una creciente producción agraria, está recibiendo mayor atención a nivel global. Una característica importante de este nutriente es su baja disponibilidad para los cultivos, debido a la gran insolubilidad de muchas de sus sales y su lenta difusión, elevada capacidad de adsorción y precipitación en los suelos. Como consecuencia, el P siempre es un factor limitante para el crecimiento de los cultivos (Bieleski 1973; Lavado 2009). La aplicación de fertilizantes de P a los suelos ha contribuido significativamente al incremento en la producción de alimentos, aumentando el contenido de P, especialmente las fracciones disponibles, en los suelos (Sharpley y Smith 1985). Sin embargo, en las últimas décadas, debido a diferentes factores, incluyendo prácticas inadecuadas de fertilización, se han extendido algunos efectos ambientales negativos (Sims y Kleiman 2005). Por esa razón, un objetivo de la agricultura es mantener un nivel óptimo de P en la rizosfera, maximizar la eficiencia de absorción radical y reducir los riesgos ambientales. Para ello es necesario la optimización del manejo del P, mejorando la eficiencia en su uso, y de esta manera, reducir el consumo de fertilizantes.

El P se encuentra presente en el suelo en formas orgánicas e inorgánicas. Éstas, se diferencian por su comportamiento y destino en el suelo (Hansen et al. 2004; Turner et al. 2007) y constituyen su reserva de P, en la forma de las fracciones de P lábil y no lábil. El ciclo del P está regulado geoquímicamente, y se encuentra influenciado fuertemente por la naturaleza de los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en la fase sólida del suelo, el grado de la actividad biológica y la química de la solución del suelo (pH, fuerza iónica, potencial redox), y varios factores medioambientales como la humedad y temperatura del suelo (Pierzynski et al. 2005). La concentración total de P en el suelo es baja y una fracción aún

más pequeña de ésta se encuentra en la solución y disponible para las plantas. La entrada del P desde la atmósfera es casi nula y en sistemas agrarios, las plantas toman P de la solución del suelo, y lo exportan con las cosechas. El P también puede perderse fundamentalmente por escurrimiento (P soluble) y erosión (P particulado), causando, entre otros problemas, contaminación de las aguas superficiales, en lo que se denomina eutrofización de sistemas acuáticos (Sims y Kleiman 2005; Zubillaga y Lavado 2016).

En general, el contenido de fósforo en los suelos es mayor en los horizontes superficiales que en los horizontes profundos. El P es absorbido por las raíces, se transporta a distintas partes de la planta y retorna al suelo en los residuos vegetales, luego de la muerte de ésta. Este proceso, que se prolonga por varias escalas de tiempo, es también, una de las formas de incorporación de materia orgánica al suelo (Pierzynski et al. 2005).

1.2. El fósforo orgánico

El fósforo orgánico (Po) es el P unido a diferentes formas del carbono. En general, el Po proviene de residuos de plantas y, en menor medida, animales, y de los microorganismos del suelo. Las plantas y los microorganismos absorben el ortofosfato de la solución del suelo, que posteriormente se une a estructuras de carbono por procesos de fosforilación, a través de numerosos procesos bioquímicos. El Po, por lo general, suele constituir entre el 30-65% del fósforo total del suelo (Harrison 1987), y existe como formas estables de fosfatos (unión C-O-P) y fosfonatos (unión C-P). Entre los principales compuestos se incluyen fosfatos de inositol, mononucleótidos, fosfatos de azúcar, fosfoproteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y fitatos. (Turner et al. 2004; Condon et al. 2005). El Po del suelo puede ser liberado mediante procesos de mineralización llevados a cabo por enzimas extracelulares secretadas por microorganismos del suelo y por las raíces de las plantas. Estos procesos son afectados

por la humedad y el pH del suelo, la temperatura, y el potencial redox (Shen et al. 2005). Los procesos biológicos del ambiente edáfico, como la actividad microbiana, tienden a controlar la mineralización e inmovilización del Po. Las transformaciones del Po son importantes porque determinan parte de la disponibilidad total del P, que también posee influencia en la productividad de los ecosistemas. En este sentido, varios estudios han demostrado que las distintas formas del Po en el suelo contribuyen de manera significativa a la nutrición de las plantas (Condon et al. 2005).

1.3 El fósforo inorgánico

Las formas inorgánicas del P (Pi) en general son una mezcla de cristales y precipitados amorfos de fosfatos de calcio, aluminio y hierro, entre otros. Estos minerales varían en su solubilidad y, por lo tanto, en su capacidad de suministrar P a la solución del suelo. El fosfato de calcio es, en general, más soluble que el fosfato de aluminio y este más soluble que el fosfato de hierro. Los productos de solubilidad de estos fosfatos, expresados como pKsp, son: PCa pKsp: 6-14; PAl pKsp: 28-32; PFe pKsp: 33-35 (McLean 1976), aunque estos valores son dependientes de las condiciones con las que fueron realizadas las determinaciones. Los factores que influyen en la solubilidad de P en estos minerales son: el pH, las concentraciones de Al, Fe, Ca y Mg, el comportamiento de las partículas coloidales y la humedad del suelo (Pierzynski et al. 2005). El Pi suele constituir entre el 35-70% del fósforo total del suelo (Harrison 1987). El predominio de cada fosfato está determinado por las características de la roca madre y de los procesos pedogenéticos del suelo (Sims y Sharpley 2005). En la región pampeana prevalecen los fosfatos de calcio (alrededor del 60% del total), con menores proporciones de fosfatos de hierro y aluminio, volviéndose estos últimos predominantes hacia el norte del país (Barreira y López Domínguez 1970; Culot y Bolaño 1970, Conti et al.

1977). Esta información coincide con el conocimiento clásico que sostiene que la proporción de fosfatos varía con el grado de meteorización del suelo y que los fosfatos de aluminio y hierro predominan en oxisoles y ultisoles (Álvarez y Rubio 2010).

Con el objetivo de satisfacer la demanda de P y reponer lo extraído por las cosechas, evitando así, su agotamiento de los suelos (Lavado y Taboada 2009), los productores aplican fertilizantes fosfatados de un variado grado de solubilidad al suelo. El fertilizante fosfatado aplicado al suelo, que no es absorbido en el corto plazo por las raíces, tiende a precipitar con los componentes del suelo. En determinadas circunstancias, tales como saturación de los sitios de retención, escurrimiento y aplicaciones de fertilizantes en superficie, los fosfatos solubles tienden a moverse fuera del sitio de aplicación. Este proceso generalmente ocurre siguiendo la pendiente del terreno. Ambos procesos generan una disminución en la eficiencia de la fertilización (Deubel y Merbach 2005; Sims y Sharpley 2005), causando pérdidas económicas y, a la vez, problemas ambientales, especialmente la eutrofización de los cuerpos de agua (Zubillaga y Lavado 2016).

1.4 Uso de microorganismos en el manejo del P

Para enfrentar los problemas derivados del uso de fertilizantes fosfatados, se han desarrollado diferentes estrategias para proveer P a los cultivos, reduciendo el consumo de fertilizantes. Una de ellas es la utilización de microorganismos que participan en los procesos de transformación del P del suelo. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en la solubilización de P mediados por bacterias (Mehta y Nautiyal 2001) u hongos. Entre estos últimos, se encuentran diferentes tipos de hongos formadores de micorrizas y hongos filamentosos (Bethlenfalvay et al. 1997; Cardoso y Kuyper 2006; Richardson et al. 2009). Las micorrizas pueden aumentar la capacidad de las plantas para adquirir fósforo del suelo a

través de varios mecanismos: (1) aumento del crecimiento radical a través de una extensión de raíces existentes (por ejemplo, asociaciones con micorrizas) o mediante estimulación hormonal del crecimiento de la raíz, ramificación o desarrollo de tricomas radiculares (Richardson et al. 2009a; Hayat et al. 2010), (2) alteración de los equilibrios de sorción que pueden dar como resultado una mayor transferencia de iones ortofosfato desde la solución del suelo o facilitar la movilidad del Po. Esto ocurre en forma directa o indirecta a través de la acción microbiana (Seeling y Zasoski 1993) y (3) la inducción de procesos metabólicos, que son efectivos para solubilizar y mineralizar directamente el Po o Pi del suelo poco disponibles (Richardson et al. 2009). Esto incluye el flujo de protones y aniones orgánicos, la producción de sideróforos, la liberación de fosfatasas y enzimas celulolíticas requeridas para la liberación del Po o la mineralización de residuos orgánicos y materia orgánica, respectivamente (Ryan et al. 2001).

El crecimiento de los hongos generalmente está favorecido en condiciones ácidas (Aciego y Brookes 2009) pero los hongos solubilizadores de P son capaces no solo de desarrollarse en condiciones ácidas sino también de utilizar la acidificación como un mecanismo para incrementar la disponibilidad de P a partir de fosfatos insolubles del suelo o fertilizantes fosfatados insolubles (Narsian y Patel 2000; Aciego y Brookes 2009). Muchos autores han encontrado correlación entre la disminución del pH y un incremento en la solubilización del P (Thomas 1985; Pandey et al. 2008; Xiao et al. 2009; Rinu y Pandey 2010, Spagnoletti et al. 2017). Por lo tanto, los hongos son capaces de incrementar la disponibilidad de P para las plantas (Jain et al. 2010) y, en consecuencia, se puede reducir las dosis de fertilizantes fosfatados solubles aplicados a los cultivos o permitir el uso de rocas fosfatadas insolubles, sin procesar. Algunos resultados sugieren que estos aportes y mejoras no se deben únicamente a la nutrición fosfatada de las plantas sino a otros procesos de formación del

rendimiento (Kucey 1989), por ejemplo, la producción de precursores de hormonas vegetales que estimularían el crecimiento de las plantas (Whitelaw et al. 1999).

1.5 Hongos endófitos septados oscuros (DSE)

Los endófitos septados oscuros (DSE, del inglés Dark Septate Endophytes) son un grupo de hongos capaces de colonizar raíces de las plantas estableciendo un amplio rango de relaciones simbióticas con las plantas que los hospedan (Mandyam y Jumpponen 2005). Son un grupo heterogéneo de hongos ascomicetes conidiales o estériles con hifas tabicadas y microesclerocios (agregación de células, de pared gruesa, densamente compactadas) (Jumpponen y Trappe 1998). Se ha demostrado que los DSE forman asociaciones mutualistas con las plantas hospedadoras y pueden funcionar como sustitutos o complementos de las micorrizas en ambientes bajo diferentes estreses (Beauchamp et al. 2005; Schulz y Boyle 2005; Weishampel y Bedford 2006; Usuki y Narisawa 2007). Los hongos DSE han sido observados en familias de plantas con diferentes estrategias de supervivencia, por lo tanto, poseen poca o ninguna especificidad con el hospedante. Se encuentran comúnmente en ambientes con algún tipo de estrés abiótico como suelos de ambientes áridos, salinos o contaminados (Zhang et al. 2017). El contenido de melanina que poseen sus paredes celulares podría explicar la tolerancia que presentan a estos ambientes (Ban et al. 2012). Se han identificado cepas de hongos DSE aisladas de diversas regiones del mundo, lo cual sugiere una distribución global de estos microorganismos. Debido a la poca especificidad para hospedarse, se propuso que los hongos DSE cumplen un rol muy importante en los ecosistemas (Jumpponen y Trappe 1998). Los estudios focalizados a la interacción en el sistema raíz y sus asociaciones con hongos endófitos han mostrado que estos contribuyen a la supervivencia de las plantas, determina su éxito ecológico, y modifican drásticamente las

comunidades vegetales y redes tróficas relacionadas en ambientes de estrés (Selosse et al. 2004).

Estos hongos pueden crecer de forma biotrófica y saprofítica, y dada a su gran heterogeneidad son capaces de producir diferentes efectos en su huésped (Mandyam et al. 2012). La habilidad de estos hongos en disolver fosfatos del suelo es poco conocida. Los mecanismos que desencadenan los procesos de solubilización de fosfatos que utilizan son la liberación de varios ácidos orgánicos, como el cítrico, oxálico, málico y glucónico, liberación de las enzimas, como las lipasas, amilasas, proteasas, celulasas y ligninasas (Mandyam y Jumpponen 2008); y sustancias quelantes (Alam et al. 2002; Chuang et al. 2007; Dighton 2007).

1.6 Molisoles y cultivo de sorgo de la Región Pampeana

Alrededor del 32% del territorio argentino se encuentra ocupado por Molisoles. La mayor parte de éstos se ubican en la Región Pampeana y representan los suelos más fértiles y productivos del país (Duggan y Rodríguez 2016). Los suelos de la Región Chaco-Pampeana se originaron a partir de sedimentos tipo loésicos, provenientes de andesitas y rocas basálticas ubicadas al norte de la Patagonia y en áreas pedemontanas de los Andes, en la provincia de Mendoza. En términos generales se acepta que, los sedimentos pampeanos son mineralógicamente homogéneos con dominancia de illitas (Rubio et al. 2018).

A pesar de la elevada fertilidad original de los suelos pampeanos agrícolas, asociada al material original y la vegetación de pastizal, actualmente los suelos agrícolas presentan deficiencias generalizadas de varios nutrientes esenciales, principalmente de N, P y S. Del mismo modo, se han reportado deficiencias de algunos micronutrientes como Zn y B en algunas regiones (Prystupa et al. 2012). En la región también se encuentran suelos afectados

por sales, que incluyen principalmente, pero no únicamente, a los suelos sódicos o alcalinos. La influencia del sodio sobre las propiedades del suelo y, sobre las plantas, es muy más compleja y está determinada, en principio, por los fenómenos de hinchamiento, dispersión de las arcillas y destrucción de coloides. Estos fenómenos generan problemas de reducción de la tasa de infiltración y la conductividad hidráulica, que afectan el normal crecimiento radical y problemas fisiológicos en las plantas en general. (Lavado y Taboada 2017).

Entre los principales cultivos de la región pampeana se encuentra el sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Se trata de una de las principales gramíneas cultivadas a nivel mundial, cuyo destino de mayor importancia es el consumo humano y animal. Es un cultivo de origen tropical que se adapta muy bien a regiones semiáridas, a climas cálidos y secos donde resulta difícil cultivar otros cereales. A nivel mundial ocupa el cuarto lugar en producción entre los cereales y el quinto en términos de área sembrada luego del trigo, arroz, maíz y cebada. Es un cereal exportado por Argentina, que ocupa el séptimo lugar en el ranking de producción mundial. El sorgo posee múltiples usos además de alimento, entre ellos producción de alcohol y biocombustibles. Este cereal constituye un valioso alimento de subsistencia para los países más pobres de África y Asia (FAO 2014).

Justificación

La agricultura de la región pampeana, y en la Argentina en general, fue y sigue siendo, extractiva, por lo que los suelos se fueron empobreciendo en P. Pero, ese agotamiento se manifestó en mayor proporción en las fracciones más disponibles, permaneciendo en el suelo las fracciones orgánicas e inorgánicas más insolubles (Vázquez et al. 1991). Es decir, que este proceso redujo la concentración de P total en el suelo y a su vez, el P remanente resulta cada vez menos disponible. Este fenómeno de agudo agotamiento del nutriente tomó estado

público a partir de 1980 (Darwich 1980; Vázquez et al. 1991; Urricariet y Lavado 1999). Para enfrentar este problema, los productores usualmente aplican fertilizantes fosfatados muy solubles (fosfatos de amonio, superfosfatos y otros) y en menor proporción fosfatos de baja solubilidad, como las rocas fosfóricas (Rodríguez 2016). La liberación progresiva del P se encuentra relacionada con la insolubilidad del mineral en agua (Gowariker et al. 2009). La velocidad de disolución de los fertilizantes en el suelo se encuentra regulada por diferentes factores edáficos y factores ambientales, así como características de los fertilizantes (Chien et al. 2009). El uso de hongos que contribuyan a solubilizar o reducir la insolubilización de fosfatos, puede ser una importante contribución para: reducir el consumo al mejorar la eficiencia en la fertilización y a la vez reducir sus riesgos ambientales.

Objetivo General

Evaluar los cambios en las fracciones de P y el comportamiento de hongos DSE con habilidad comprobada de acuerdo a resultados previos en solubilizar sales puras de fosfatos de calcio, aluminio y hierro, para solubilizar fosfatos y analizar su efecto sobre la absorción de P por un cultivo como el sorgo.

CAPITULO 2

**Cambios en las fracciones de fósforo del
suelo causado por la agricultura sin
reposición de nutrientes.**

2.1 Introducción

Desde los inicios de la ciencia del suelo, se ha reconocido que el P en el medio edáfico forma parte de una compleja mezcla de diferentes compuestos orgánicos (Po) e inorgánicos (Pi). El Pi se encuentra presente en el suelo formando parte de una mezcla de compuestos amorfos y cristalinos de fosfatos de calcio (Ca), aluminio (Al) y hierro (Fe), incluyendo los fosfatos adsorbidos y precipitados en superficie coloidales. El Po comprende principalmente fosfatos de inositol, fosfolípidos, ácidos nucleicos y fitatos entre otros (Pierzinki et al. 2005).

El conocimiento de las diferentes formas del P en el suelo es necesario para comprender la química de este nutriente y su dinámica en el medio ambiente. Es por eso que desde los comienzos del siglo XX se estudió el fraccionamiento del Pi. A mediados de la década de 1950 se publicó una metodología de extracción secuencial del Pi utilizando diferentes solventes (Chang y Jackson 1957). Esta metodología proveyó una primera descripción del P del suelo y su relación con otros componentes del suelo. Este método de extracción secuencial extrae el P lábil, el P unido al Ca, unido al Al, al Fe y el denominado P residual. Sin embargo, debido a sus limitaciones, diferentes autores han realizado modificaciones con el propósito de mejorar/optimizar el método (Sparks et al. 1996).

Por otro lado, a mediados de la década de 1980 la mirada sobre las distintas fracciones de P del suelo sufrió un cambio, centrándose más en la labilidad del nutriente que en su composición química (Hedley et al. 1982; Pierzinki et al. 2005; Sharpley y Smith 1985). Las formas de P lábil comprenden desde la que se encuentra en solución del suelo y las que se encuentran débilmente adsorbidos a las partículas del suelo, siendo esta fracción la que se encuentra directamente disponible para la planta (Costa et al. 2015). Utilizando esas metodologías, se estableció que la extracción de P por los cultivos sin la reposición adecuada del nutriente causa no solo una disminución de la concentración del P del suelo sino también

el incremento relativo de las formas menos disponibles del P remanente. Inversamente, cuando se fertiliza y exceden los requerimientos de P de los cultivos se incrementan las fracciones biodisponibles. Estas fracciones pasan a integrar las porciones más insolubles con el paso del tiempo (Tiessen et al. 1983; Sharpley y Smith 1985), lo que produce cambios en la labilidad de las fracciones de P en el suelo (Verma et al. 2004).

Una de las regiones del mundo donde la producción comercial de cultivos fue llevada a cabo apoyándose básicamente en la fertilidad natural del suelo fue la Región Pampeana. La agricultura empezó a finales del siglo XIX, y lentamente la producción se extendió por toda la región hasta ser, finalmente, la actividad dominante. La producción agrícola fue sostenida principalmente por la alta fertilidad inicial de los suelos, en su mayoría Argiudoles y Hapludoles (Lavado y Taboada 2009; Rubio et al. 2018). Una consecuencia fue que el carbono orgánico y el nitrógeno total disminuyeron entre 30 y 50% comparado con su valor inicial (Vazquez et al. 1990, Urricariet y Lavado 1999, Alvarez 2001). Por otro lado, este manejo sin reposición de nutrientes del suelo llevó a una caída en la concentración del P (Darwich 1980; Lavado y Taboada 2009; Urricariet y Lavado 2001). Recién a principios de la década de 1990 comenzó la fertilización en escala masiva. La aplicación de nutrientes es ahora una práctica común, pero la media de aplicación de fertilizantes aún es baja, y la exportación de nutrientes, debido a la agricultura, excede la entrada de nutrientes al suelo. Al presente, la fertilización restaura sólo alrededor del 39% del P removido por los cultivos en la región (Cruzate y Casas 2017).

El fraccionamiento del P del suelo en la región Pampeana, ha sido estudiado hace varios años, utilizando el criterio de Chang y Jackson y en esos trabajos pioneros se encontró, una predominancia del P unido al Ca (Barreira y López Domínguez 1970; Conti et al. 1976; Culot y Bolaño 1970). Estos resultados resultan coherentes con el material parental (sedimentos

loésicos) y el tipo de procesos pedogenéticos de esos suelos (Pierzynski et al. 2005). El P unido al Al y Fe tienden a incrementarse hacia el norte de Argentina, donde predominan suelos más ácidos (Fernández López et al. 2006). Posteriormente, el Pi fue estudiado utilizando la metodología de Hedley et al. (Vazquez et al. 1991). Estos autores confirmaron localmente que las formas más lábiles de P disminuían, incrementándose proporcionalmente las formas menos lábiles cuando se desarrolla agricultura sin reposición de nutrientes, en este caso P.

Hipótesis: El agotamiento del fósforo en el suelo cultivado afecta principalmente al P ligado al calcio, disminuyéndolo y, como consecuencia, se produce un aumento proporcional de las fracciones de fosfatos de Al y Fe.

Objetivo: Determinar en qué medida la agricultura sin reposición adecuada de P, modificó las fracciones de P del suelo, estudiando un suelo cultivado y otro prístino.

2.2 Materiales y Métodos

El muestreo se realizó en un establecimiento cercano a la ciudad de Junín provincia de Buenos Aires, Argentina (-34.585; -60.9589). El suelo es, según la USDA Soil Taxonomy versión 2006, un Hapludol típico serie Junín, Limosa gruesa; mixta, térmica (INTA, 2018).

Las principales características del suelo se indican en el Cuadro 2.1.

Por más de 100 años la producción ganadera fue la actividad principal de la zona y del establecimiento, en particular. La alimentación del ganado se basaba en el “campo natural” (remanente del pastizal original, con marcados cambios en la vegetación). También se sembraba alfalfa, y se producían cultivos periódicamente, principalmente maíz. La frecuencia de cultivos se incrementó a partir de la década de 1970; posteriormente a partir de

la década de 1990, se cultivaron en el establecimiento, en forma continua, principalmente soja, maíz y cebada. En los últimos años el maíz se fertilizó con urea, la soja con superfosfato simple y la cebada no recibió fertilización alguna.

Cuadro 2.1. Características del perfil representativo del Hapludol serie Junín (INTA 2018).

Horizontes	Ap	A	Bw	BC	C
Profundidad (cm)	0-16	16-30	30-70	70-126	126-150
Carbono Orgánico (%)	1,15	1,03	0,91	0,16	0,10
Nitrógeno total (%)	0,113	0,103	0,092	NA	NA
Relación C/N	10	10	10	NA	NA
Arcilla < 2 μ (%)	15,2	16,3	16,3	11,8	11,3
Limo 2-50 μ (%)	26,3	25,0	24,4	21,6	21,5
Arena 50-2000 μ (%)	58,5	58,7	59,3	66,6	67,2
pH en pasta	5,6	5,9	6,2	6,5	6,8
pH H₂O 1:2.5	6,1	6,4	7,3	7,5	7,9
Ca inter. meq./100g	9,2	9,9	9,0	8,4	6,6
Mg inter. meq./100g	1,7	1,5	2,2	2,5	3,6
Na inter. eq./100g	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
K inter. meq./100g	1,2	1,3	0,6	0,6	0,8
H inter. meq./100g	4,5	4,7	2,7	1,9	1,6
CIC meq./100g	14,2	14,8	12,6	11,7	10,8

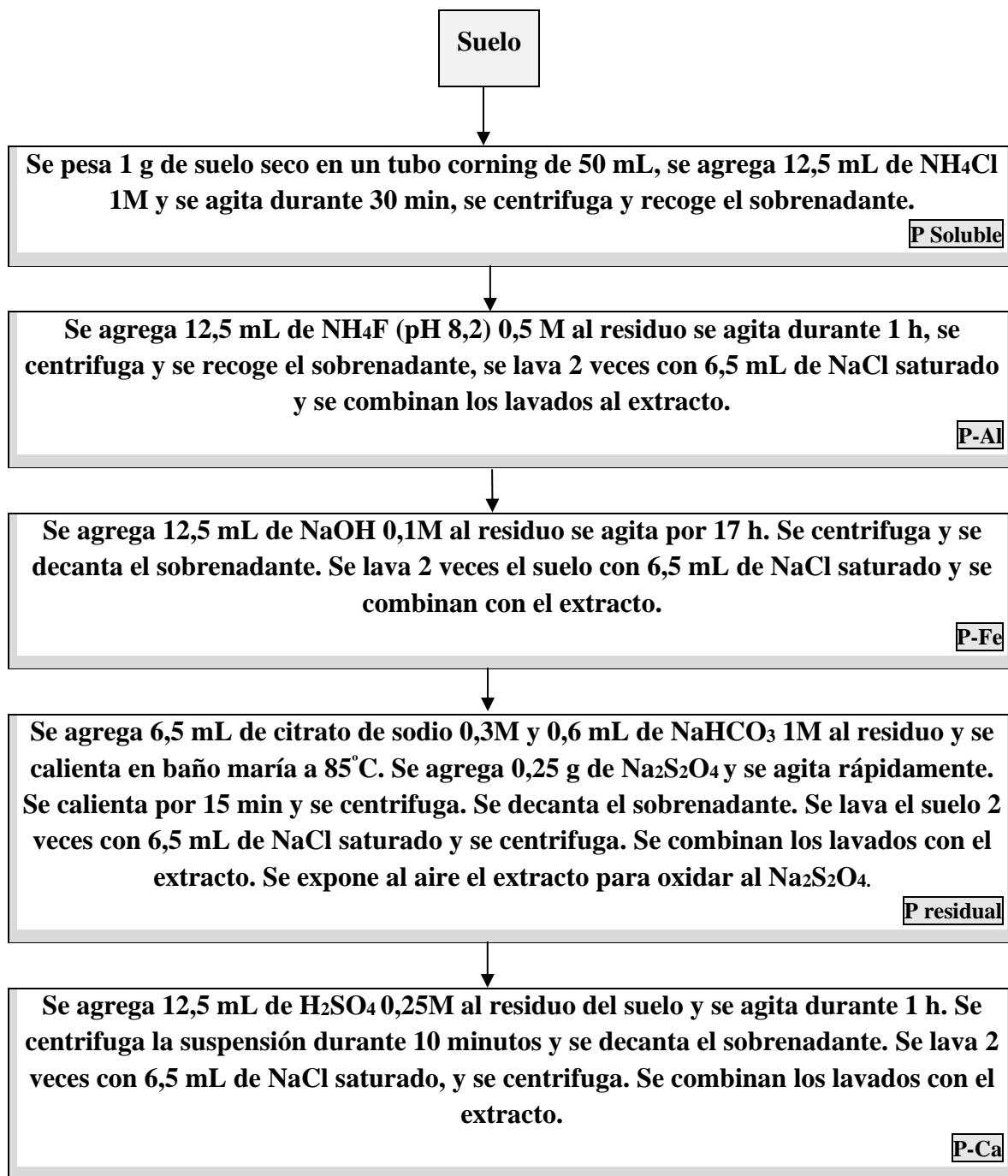
Se tomaron seis muestras dentro de parcelas cultivadas, que representaron al suelo bajo agricultura, (el suelo cultivado) y otras seis tomadas en un área no cultivada rodeada de árboles implantados hace muchos años y debajo de un alambrado perimetral cercano, también instalado en tiempos pasados. Estos últimos representan al suelo prístino (o, al menos, lo más cercano a él). Cada muestra fue el producto de varias submuestras homogeneizadas, tomadas en la profundidad del horizonte Ap.

Se utilizó la técnica de extracciones secuenciales de Chang y Jackson, modificada por Williams et al (Sparks et al. 1996). El esquema de fraccionamiento se presenta en la figura 2.1. Se observa que el P soluble fue extraído inicialmente, luego el P ligado al Al, el P ligado

al Fe y el P residual. Finalmente se extrajo el P ligado al Ca. Para la extracción del P orgánico se utilizó la técnica modificada por Saunders y Williams (Sparks et al. 1996). El fósforo se cuantificó utilizando la metodología del ácido ascórbico de Murphy y Riley (Sparks et al. 1996). El carbono orgánico fue determinado por el método de Walkey y Black (Sparks et al. 1996).

Las fracciones de P se determinaron en muestras que no representaban verdaderas repeticiones (pseudoréplicas) y por lo tanto fueron limitadas para una evaluación estadística. El sitio experimental se eligió por presentar suelos muy homogéneos (INTA, 2018), lo que permitió suponer que los suelos para ambos tratamientos fueron inicialmente similares, y las diferencias fueron causadas por los tratamientos. Como consecuencia, el nivel de inferencia estadística no va más allá de los lotes que se muestrearon en la presente tesis (Hurlbert 1984). Con estas limitaciones, se aplicó la prueba de ANOVA para distinguir las diferencias significativas entre los parámetros medidos. Las medias se compararon usando el test de diferencias mínimas significativas (LSD, $p < 0,05$).

Figura. 2.1 Esquema de las etapas del fraccionamiento de P inorgánico de Chang y Jackson, modificada por Williams et al., para suelos no calcáreos (Sparks et al. 1996)



2.3 Resultados

El contenido de carbono orgánico en el suelo prístino fue de $3,09 \pm 0,15\%$ y en el suelo cultivado $1,72 \pm 0,11\%$, un decrecimiento significativo del 44,4%. El P total fue de 956,3 mg/kg y 697,0 mg/kg para los suelos prístino y cultivado respectivamente, un decrecimiento del 27,12%. El Cuadro 2.2 y la Figura 2.2 muestran el decrecimiento de P orgánico, P-Ca y el P residual para ambos suelos (prístino y cultivado), en términos absolutos y relativos. La disminución significativa de estas fracciones fue expresada en porcentajes: 55,9; 49,1 y 44,1 respectivamente. Sin embargo, hubo incrementos significativos para el P-Al y el P-Fe (144,8% y 100,4%, respectivamente).

Cuadro 2.2. Concentraciones determinadas en las fracciones de P de los suelos prístino y cultivado expresado en mg/kg

Fracción	Suelo prístino	Suelo cultivado
P-Ca	$95,7 \pm 6,8$	$48,8 \pm 2,5^{(*)}$
P-Al	$73,2 \pm 8,3$	$179,2 \pm 5,6^{(*)}$
P-Fe	$47,7 \pm 0,8$	$95,6 \pm 3,1^{(*)}$
P residual	$229,2 \pm 2,2$	$128,2 \pm 0,5^{(*)}$
P orgánico	$474,3 \pm 3,4$	$209,2 \pm 7,2^{(*)}$
P soluble	$36,2 \pm 0,8$	36 ± 2

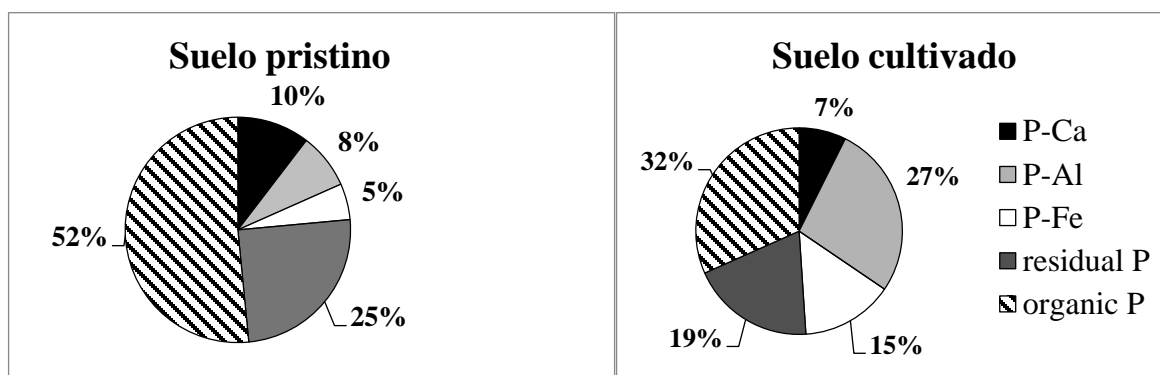


Figura 2.2. Modificaciones encontradas en las proporciones de las distintas fracciones de P orgánico y demás fracciones de P inorgánico para los suelos prístino y cultivado.

Discusión

El contenido de carbono del suelo cultivado fue un 44,8% del registrado en el suelo prístino. Es un hecho conocido la ocurrencia de decrecimiento del CO en suelos cultivados cuando se compara con el contenido de CO en el suelo prístino (Follet et al. 1987; Urricariet y Lavado 1999). El P orgánico siguió la misma tendencia encontrada por Vázquez et al. (1991) y otros (Hedley et al. 1982; Sharpley y Smith 1985); en este caso, el P total se redujo un 22,12% en el suelo cultivado respecto al suelo prístino. En la presente investigación, el C orgánico y el P orgánico decrecieron relativamente en un grado similar.

La remoción de P causada por la cosecha de cultivos es considerada el factor principal del cambio de la composición inorgánica del P del suelo. El decaimiento del P-Ca puede ser atribuido a su mayor solubilidad comparando con el P-Al y P-Fe (McLean 1976). El decrecimiento del P residual en el suelo cultivado puede estar relacionado con lo encontrado por Guo et al. (2000), quien indicó que en algunos suelos esta compleja fracción de P puede estar disponible para las raíces. La proporción de P unido al Al y al Fe incrementaron no solo en términos absolutos sino en términos relativos. Este incremento no fue causado únicamente por la remoción del P-Ca a lo largo de las cosechas. Guo et al. (2000) mencionaron que parte del P residual y P orgánico podrían transformarse en las fracciones de P-Al y P-Fe, pero este hecho no ha sido verificado en esta tesis.

Conclusiones preliminares

Estos resultados concuerdan parcialmente con la hipótesis. Debido a la remoción de P causado por la cosecha, el P-Ca decreció en términos absolutos y relativos. Sin embargo, el P unido al Al y Fe aumentaron en concentración absoluta y relativa, lo que demuestra que las fracciones de P residual y P orgánico contribuyeron con este aumento.

Si los resultados hallados en el presente capítulo, a partir de un lote específico, pudieran ser generalizados, significaría que tuvo lugar un cambio permanente en la composición de las fracciones de P inorgánico para suelos cultivados en esta región. Considerando la baja tasa de aplicación de P en la agricultura pampeana, el incremento proporcional de P en formas insolubles significa un menor aporte del nutriente a los cultivos.

CAPITULO 3

Efecto de hongos endófitos septados oscuros en las fracciones de P inorgánico en suelos cultivados

3.1. Introducción

La sustentabilidad, además de la productividad y la rentabilidad, es un objetivo actual de los agroecosistemas. Por esa razón, y atendiendo a una mayor responsabilidad ambiental, el futuro de la agricultura exige innovaciones en las prácticas intensivas convencionales (Tilman et al. 2002). Por lo tanto, muchas técnicas sustentables en la producción agrícola se basan en el conocimiento de la ecología de las poblaciones involucradas en los procesos. Especialmente, las poblaciones microbianas, las cuales ejercen un rol importante en el desarrollo de los cultivos y la calidad del suelo. Entre las poblaciones microbianas se encuentran los hongos DSE (Mandyam y Jumpponen 2005).

En el suelo, la colonización inicial del hongo DSE sobre la raíz de las plantas se inicia con las hifas superficiales también llamadas “runner hyphae” (Jumpponen y Trappe 1998). Estas hifas usualmente se desarrollan a lo largo de las células epidérmicas adyacentes y colonizan el espacio existente entre las células corticales en sentido al eje principal de la raíz (Currah et al. 1993). Durante este proceso de colonización superficial, puede formarse una red de hifas similar a una red parcial de Hartig (Stoyke y Currah 1993). Eventualmente, esta hifa penetra las células corticales externas o los pelos radicales (O’Dell et al. 1993). Una vez que el hongo se encuentra en la capa epidérmica, las hifas pueden crecer paralelas al eje principal de la raíz del huésped por lo general sin causar modificación en las mismas. El paso de las hifas a través de las paredes de las células epidérmicas se da a través de estrechos tubos de penetración (Currah et al. 1993; O’Dell et al. 1993).

Spagnoletti et al. (2017) estudiaron la capacidad de especies de hongos DSE aislados de cultivos de la región pampeana para disolver fosfatos de calcio, aluminio y hierro, en la forma de sales puras. Estos autores encontraron que *Drechslera* sp. fue el hongo más eficiente en

disolver fosfato de calcio, *Curvularia* sp. en solubilizar fosfato de aluminio y *Ophiosphaerella* sp. en solubilizar fosfato de hierro. El hongo *Setosphaeria rostrata* no fue el que tuvo un comportamiento óptimo con cada fosfato en particular, pero mostró una buena performance con todos ellos. En este sentido, en la literatura se registran varios ejemplos similares. Barrow y Osuna (2002) demostraron que el hongo DSE *Aspergillus ustus* puede solubilizar fosfatos del suelo y aumentar su disponibilidad para *Atriplex canescens*. Tarafdar y Rao (1996) encontraron que entre los hongos que habitan la rizosfera, especies del género *Aspergillus* presentaron la mayor actividad fosfatasa y mejoraron significativamente la solubilización y absorción de P, resultando en el incremento de la biomasa de trigo. Por su parte, Surono y Narisawa (2018) encontraron una promoción de crecimiento en plantas de *Asparagus officinalis*, en presencia de 3 aislamientos del hongo DSE *Phialocephala fortinii* en medios con fuentes de fósforo y nitrógeno orgánico.

En el presente capítulo se estudia la capacidad de las cepas de hongos utilizadas por Spagnoletti et al. (2017) para extraer P de las distintas fracciones inorgánicas que se encuentran en los suelos.

Hipótesis: El hongo DSE que demostró previamente mejor rendimiento global frente a fosfatos puros, *Setosphaeria rostrata* (G1A), presentará mayor grado de disolución de fosfatos en suelos, en comparación con los hongos que exhibieron capacidad solubilizadora en alguna de las sales.

Objetivo: Determinar en un ensayo *in vitro* el efecto de hongos DSE solubilizadores de fosfatos sobre las principales fracciones de P en suelos cultivados adyacentes, con diferente historia agrícola.

3.2 Materiales y Métodos

Selección de hongos DSE

Se seleccionaron cinco hongos que presentaron el mejor potencial solubilizador de fosfatos de acuerdo con Spagnoletti et al. (2017), Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1: Hongos DSE aislados e identificados con potencial actividad solubilizadora de fosfatos inorgánicos.

Suelo	Hospedante	Identificación	Nombre científico
Argiudol Típico	<i>Triticum aestivum</i>	13-5	<i>Alternaria alternata</i>
Argiudol Típico	<i>Triticum aestivum</i>	12-13	<i>Ophiosphaerella herpotricha</i>
Argiudol Típico	<i>Triticum aestivum</i>	P6	<i>Drechslera</i> sp.
Natracualf Típico	<i>Chloris gayana</i>	G1A	<i>Setosphaeria rostrata</i>
Natracualf Típico	<i>Chloris gayana</i>	G1B	<i>Curvularia</i> sp.

Los inóculos para este ensayo se obtuvieron haciendo una siembra de cada uno de los hongos en cajas de Petri con agar extracto de malta (AEM) durante 7 días, a 25 ± 2 °C, en oscuridad.

Preparación de microcosmos y análisis fisicoquímicos

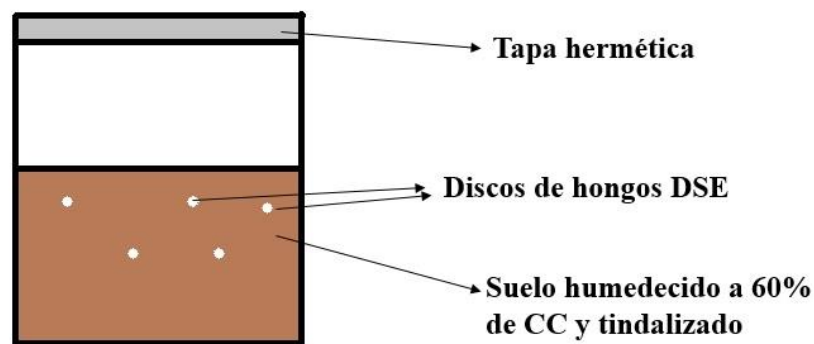
Los suelos utilizados para la preparación de los microcosmos fueron muestreados en el mismo establecimiento indicado en el capítulo anterior. Se trata de dos Hapludoles Típicos con distinta historia agrícola. Uno de ellos fue extraído en un lote con soja, que fue fertilizado previamente a la toma de muestras con superfosfato triple. El otro suelo fue muestreado alrededor de un molino con un área no cultivada en el presente. Se atribuyó al primer suelo una larga historia agrícola y al segundo una historia agrícola menor.

Se pesaron 100g de suelo seco, previamente tamizado, humedecido al 60% de capacidad de campo y tindalizado en frascos de vidrio (microcosmos) con tapa hermética. A cada microcosmo se agregó cloranfenicol al 1% y 5 discos de 0,5 cm de diámetro de la zona activa de la colonia de cada uno de los hongos.

Los factores evaluados fueron: (1) Sustratos: ambos suelos, (2) Hongos: los 5 hongos DSE mencionados y el tratamiento control (sin aplicación de hongo).

Los tratamientos resultantes de la combinación de ambos fueron doce. Se trabajó por quintuplicado y en condiciones controladas de luz y temperatura, asegurando que todo el micelio entre en contacto con la masa total del suelo.

Figura 3.1: Esquema de los recipientes utilizados en la preparación de microcosmos utilizados en el ensayo



Luego de 20 días de crecimiento se extrajo una muestra compuesta de cada microcosmos extrayendo 30 submuestras de 1g, obteniéndose de este modo, 30g de suelo inoculado para cada microcosmo. Se procedió a cuantificar las fracciones de P inorgánico utilizando la misma metodología analítica empleada en el capítulo anterior.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software RStudio (versión 1.1.453 para Windows *RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>*) para el análisis de un ANOVA. Para evaluar las diferencias entre las medias de tratamiento se usó la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0,05$).

3.3 Resultados

En los cuadros 3.2 y 3.3 se muestran los valores de las distintas fracciones de P inorgánico obtenidos en los distintos tratamientos con los hongos estudiados, en ambos suelos.

Del análisis de los cuadros 3.2 y 3.3 surge que *Alternaria alternata* (13-5), *Drechslera* sp. (P6), *Setosphaeria rostrata* (G1A) y *Curvularia* sp. (G1B) se comportaron en forma diferente en cada suelo estudiado. En cambio, *Ophiosphaerella herpotricha* (12-13) produjo idénticas modificaciones en las fracciones de P, en ambos suelos.

En el cuadro 3.2 se observa que en este suelo, *Alternaria alternata* (13-5) disminuyó significativamente las fracciones P soluble, P-Al y P-Ca, sin que varíen significativamente las otras fracciones; con *Drechslera* sp. (P6), en cambio, se incrementó significativamente la concentración de P-Al y P-Ca, disminuyendo significativamente la fracción de P-Fe; *Setosphaeria rostrata* (G1A), por su parte, tuvo una disminución significativa en las fracciones de P soluble y P-Fe, aumentando la fracción P-Al; *Curvularia* sp. (G1B) presentó un efecto significativo sobre las fracciones de P residual y P-Ca, disminuyéndolas significativamente. Finalmente, *Ophiosphaerella herpotricha* (12-13) aumentó significativamente la fracción de P residual.

En el suelo con corta historia agrícola, *Alternaria alternata* (13-5) disminuyó significativamente las fracciones P-Al, P-Fe y P-Ca, aumentando la concentración de la fracción de P residual; *Drechslera* sp. (P6) ejerció sus efectos sobre las fracciones de P soluble, P-Al, P residual, aumentándolas, pero redujo la fracción P-Ca; *Setosphaeria rostrata* (G1A) incrementó las fracciones de P-Al y P residual, mientras que la fracción de P-Fe disminuyó significativamente; *Curvularia* sp. (G1B) disminuyó las fracciones de P-Fe y P-

Ca, mientras aumentó la fracción de P residual. *Ophiosphaerella herpotricha* (12-13) presentó el mismo comportamiento que en el suelo cultivado.

Cuadro 3.2: Cambios registrados en las distintas fracciones de P expresado en mg/kg, luego de 20 días de crecimiento de los hongos en los microcosmos con un suelo con larga historia agrícola.

Fracción	Testigo	Hongos				
		13-5	P6	G1A	G1B	12-13
P Soluble	38,2 ±2,05 ab	28,9 ±3,66 c	33,75±1,39 bc	32,95±2,64 c	38,77±2,29 a	40,16±1,06 a
P-Al	203,09±5,59 b	182,98 ±2,68 c	218,74±6,21 a	220,22±3,74 a	196,32±2,68 b	204,48±1,92 b
P-Fe	153,23±5,94 ab	142,99±9,00 bc	127,96±8,86 d	128,76±8,87 cd	163,12±9,32 a	145,12±4,20 b
P Residual	136,98±5,65 bc	132,04 ± 7,06 bc	129,75±1,67 cd	142,82±5,47 b	120,94±7,36 d	169,64±2,70 a
P-Ca	122,19±0,64 b	115,55±3,89 c	137,00±3,59 a	118,39±1,51 bc	101,16±1,50 d	118,51±3,24 bc

Cuadro 3.3: Cambios registrados en las distintas fracciones de P expresado en mg/kg, luego de 20 días de crecimiento de los hongos en los microcosmos con un suelo con corta historia agrícola.

Fracción	Testigo	Hongos				
		13-5	P6	G1A	G1B	12-13
P soluble	37,98 ± 1,59 bc	34,38 ± 1,82 c	44,39 ± 3,27 a	37,16 ± 0,73 bc	38,66 ± 1,73 b	37,88 ± 1,17 bc
P-Al	44,74 ± 0,59 cd	37,92 ± 1,12 e	52,43 ± 3,09 b	57,37 ± 3,44 a	49,12 ± 1,45 bc	44,13 ± 2,97 d
P-Fe	89,94±3,33 a	72,10 ± 1,48 b	88,38±1,72 a	64,54 ± 2,27 c	75,66 ± 2,75 b	88,05±2,28 a
P Residual	224,22±2,54 d	285,69±5,14 a	288,71± 4,56 a	272,36±6,35 b	275,49±4,99 b	233,17±3,21 c
P-Ca	86,85 ± 3,63 a	80,43 ±2,75 b	81,10 ± 1,25 b	88,18 ± 1,47 a	79,54 ± 2,49 b	87,30 ± 2,72 a

Observación: Las diferencias entre medias se indican entre los distintos hongos para cada fracción.

3.4 Discusión

Debido a la fertilización realizada con superfosfato triple, previo al muestreo de los suelos, las fracciones de P del suelo con larga historia agrícola sufrieron modificaciones (Beck y Sanchez 1994) comparadas con los resultados mostrados en el capítulo anterior. No obstante, se verificó que las fracciones del P en el suelo agrícola han sido modificadas por la extracción del nutriente luego de años de agricultura, puesto que se presentó una mayor concentración de P-Al y P-Fe comparándola con la fracción de P-Ca, coincidiendo con lo demostrado en el capítulo previo. A nivel porcentual el P residual se encontró en el orden del 25% para el suelo con larga historia agrícola, mientras que en el de corta historia se registró el 50%. Esta disminución en la concentración del P residual en uno de los suelos fue discutida en el capítulo 2. En las figuras 3.2 y 3.3 se observa el porcentaje de las fracciones inorgánicas del P y el efecto de los DSE sobre las mismas. Estas figuras evidencian en forma gráfica la magnitud de los cambios causados por los hongos en las fracciones de P. Se observa que las características de los suelos han condicionado la actividad de los DSE. Por ejemplo, en el suelo con corta historia agrícola el hongo G1A disminuyó significativamente la concentración de P-Fe, en cambio, en el suelo con larga historia esta fracción no sufrió modificación.

La actividad solubilizadora presentó diferencias con el comportamiento encontrado por Spagnoletti et al. (2017), ya que los hongos afectaron fracciones de P del suelo de forma diferente a lo encontrado en presencia de las sales puras, como fueran indicadas en el trabajo mencionado. Asimismo, los suelos que han sido diferenciados por su uso, presentaron alguna diferencia en la actividad solubilizadora de los hongos DSE estudiados. De acuerdo con lo mencionado por Richardson y Simpson (2011), la actividad de los microorganismos

mantiene una estrecha relación con se las características fisicoquímicas de la rizosfera. Esto es, la parte del suelo circundante a las raíces activas y que están bajo la directa influencia de éstas, que incluye los exudados radicales de las plantas, la composición del suelo y otros factores del medio edáfico, incluyendo la biota (Smith y Smith 2011). En las figuras 3.4 y 3.5 se puede observar cómo los hongos DSE han modificado de manera diferente la fracción del P residual en ambos suelos.

Estas modificaciones de las fracciones de P inorgánico han llevado a que, en algunos casos, aumente la concentración de alguna fracción, mientras que otra disminuya. Sin embargo, el equilibrio en las fracciones de P inorgánico también puede ser alterado por las fracciones del P orgánico (Pierzynski et al. 2005), por acción de enzimas u otras sustancias liberadas al suelo por el hongo DSE. También puede influir la incorporación de P en la biomasa del hongo (Jumpponen 2001). Por lo tanto, teniendo en cuenta, como ejemplo, la fracción de P residual para *Ophiosphaerella herpotricha* (12-13), donde aumenta en ambos suelos, se puede inferir que el hongo DSE esté mineralizando P orgánico que pasa a la fracción residual.

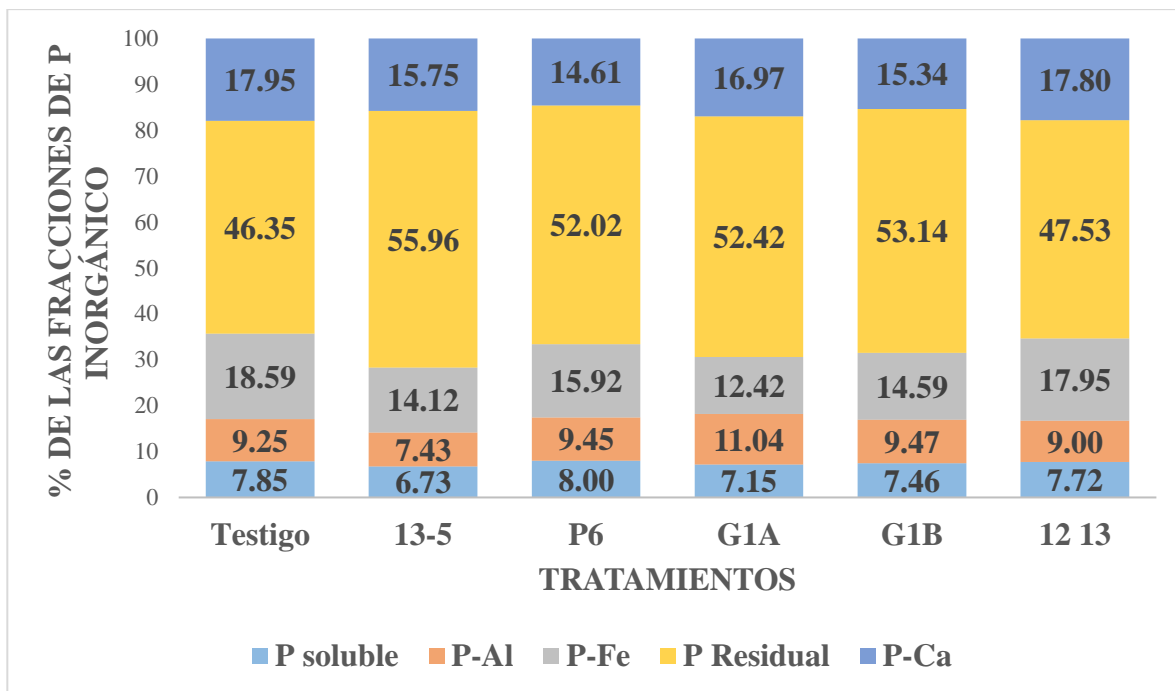


Figura 3.2: Efecto de los hongos DSE sobre las fracciones de P inorgánico del suelo con corta historia agrícola, expresado en porcentaje.

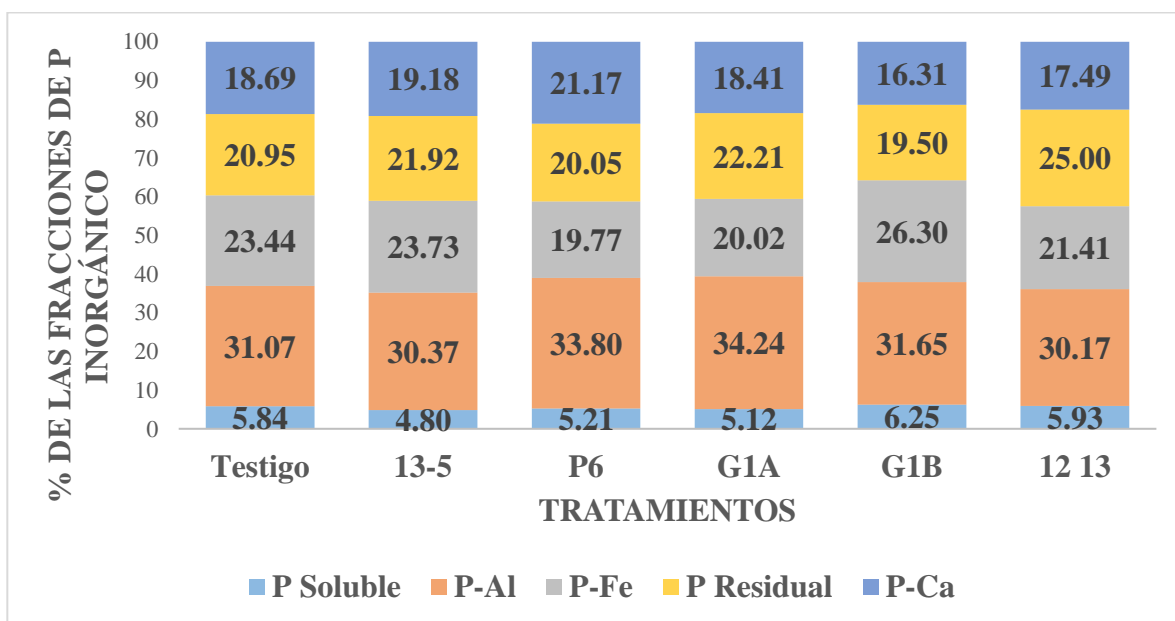


Figura 3.3: Efecto de los hongos DSE sobre las fracciones del P inorgánico del suelo con larga historia expresado en porcentaje.

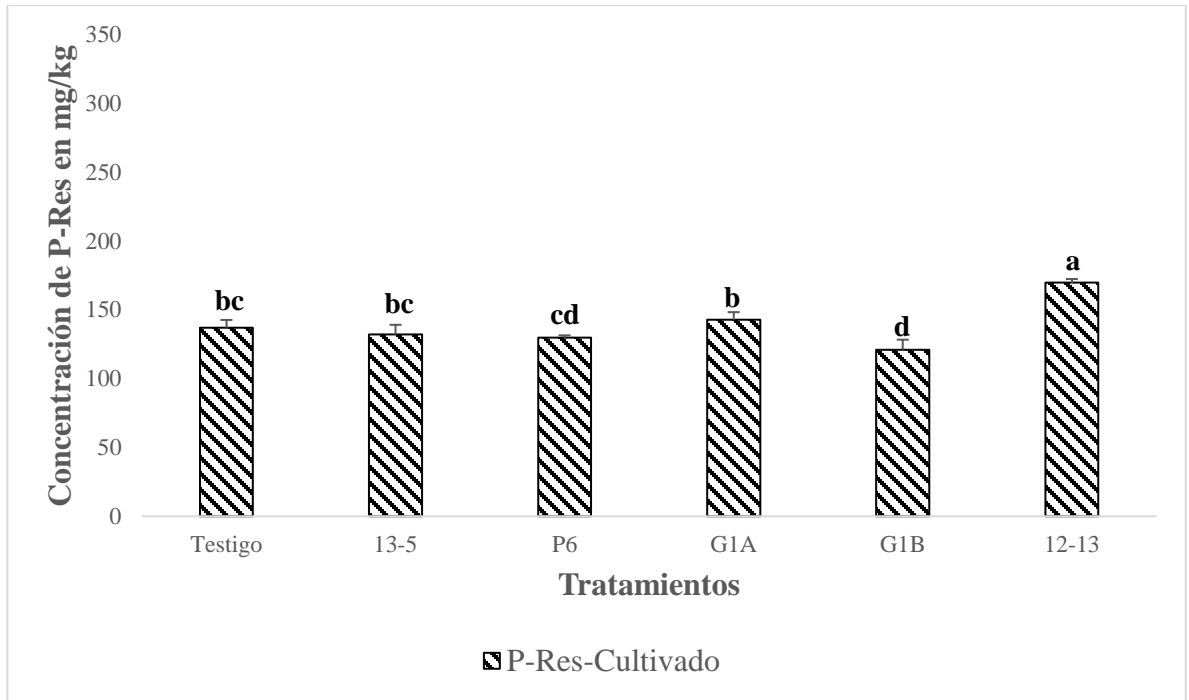


Figura 3.4: Efecto de los hongos DSE sobre la fracción de P residual en el suelo con larga historia agrícola.

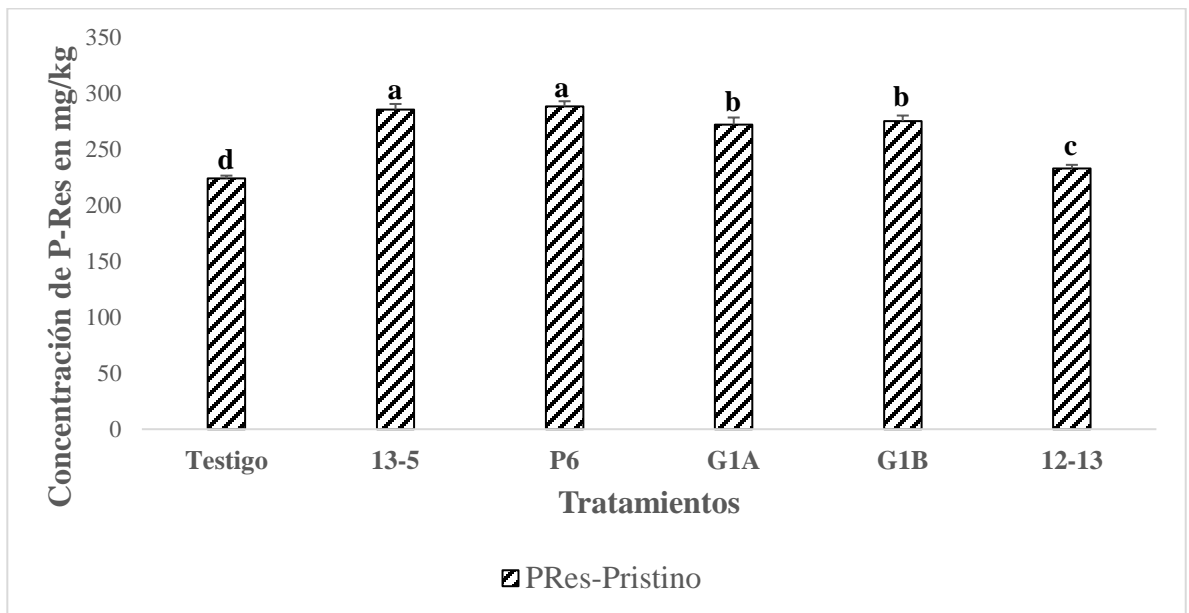


Figura 3.5: Efecto de los hongos DSE sobre la fracción de P residual en un suelo con corta historia agrícola.

3.5 Conclusiones preliminares

Los hongos DSE presentan diferente potencial para solubilizar las fracciones de P de los suelos. Este potencial solubilizador se encuentra condicionado al ambiente de crecimiento de los hongos DSE, en este caso los suelos utilizados. El hongo que presentó una mayor disminución en la concentración de P-Ca fue *Curvularia* sp. (G1B), en la fracción P-Al fue *Alternaria alternata* (13-5) y en la fracción de P-Fe fue *Setosphaeria rostrata* (G1A). Se pudo comprobar que el hongo *Setosphaeria rostrata* ha sido el que ha tenido mejor rendimiento global, validando la hipótesis planteada.

CAPITULO 4

Respuesta de plantas de *Sorghum bicolor* a la inoculación con hongos endófitos septados oscuros (DSE)

4.1. Introducción

Los hongos DSE podrían actuar de modo similar a hongos endo- o ectomicorrícicos, logrando de este modo mejorar el crecimiento del hospedante (Lewis 1987; Treu et al. 1996; Jumpponen 2001), aunque algunas cepas de DSE, son patógenos débiles e inclusive son capaces de provocar importantes enfermedades (Wilcox y Wang 1987b). En el caso de otros tipos de hongos, como los micorrícicos, el micelio extradical ayuda a explorar mayor volumen de suelo, siendo capaz de absorber nutrientes donde la raíz de la planta no accede, contribuyendo así al desarrollo de la misma (Cavagnaro et al. 2015).

Es ampliamente conocida la interacción que ocurre entre los cultivos y microorganismos, como los hongos micorrícicos arbusculares (AMF), que pueden beneficiar la producción agrícola. Algunos autores estudiaron los efectos de la co-inoculación entre ambos tipos de hongos (DSE y AMF). Por ejemplo, Scervino et al. 2009 comprobaron que los exudados de los hongos DSE modulan el crecimiento de hongos AMF. Sin embargo, no se posee información sobre la interacción de hongos DSE con otros hongos filamentosos, como en nuestro caso con un hongo comercial, solubilizador de P del suelo.

En la región Pampeana, además de los Molisoles que poseen adecuadas condiciones para la agricultura, existen grandes superficies ocupadas con suelos con horizontes alcalinos, tales como Natracuoles, Natracualfes, Natralboles, que poseen diferente aptitud de uso. Muchos de ellos no poseen una definida vocación agrícola y han sido utilizados para la implantación de pasturas (Taboada et al. 2011). Algunos cultivares de sorgo emergen como una posibilidad de desarrollar cultivos en ellos (Pittaro et al. 2019)

En el caso del sorgo, estudios previos determinaron que *Exophiala pisciphila* (hongo DSE) forma una asociación mutualista, promoviendo la supervivencia de esta especie en ambientes de estrés hídrico (Zhang et al. 2017). Así mismo, Vergara et al. (2017) determinaron que distintas cepas de DSE fueron capaces de proveer nutrientes a partir de rastrojo de trigo, a su vez Li-qin et al. (2010) encontraron que un hongo DSE (congenérico a *Mycocentrospora*) promovió el crecimiento de *Saussurea involucrata*. Sin embargo, la habilidad de los hongos DSE para facilitar la absorción de P por el sorgo en suelos de distintas características, es desconocida.

Hipótesis

La respuesta de las plantas de sorgo a la inoculación con hongos DSE será similar a la respuesta del cultivo frente a un hongo solubilizador de P comercial.

Objetivo

Corroborar la eficiencia de la actividad solubilizadora de P de hongos DSE pre-seleccionados y un hongo comercial, así como la combinación entre ellos, a través de la producción de biomasa y absorción del nutriente por parte del sorgo, en un suelo ácido y otro alcalino y en condiciones de crecimiento distintas (luz y temperatura) dadas por el invernáculo utilizado.

4.2 Materiales y Métodos

Se seleccionaron los hongos que presentaron mayor efecto sobre las fracciones de P de los suelos estudiados en el capítulo anterior. Por lo tanto, se seleccionó: *Curvularia* sp. (G1B) por producir un mayor cambio sobre la fracción de P-Ca y sumado a que es un hongo DSE aislado de un Natracualf típico, y *Alternaria alternata* (13-5) debido a que demostró, en el capítulo anterior, tener un efecto significativo disminuyendo las fracciones de P-Ca y P-Al, principalmente P-Al. Además, se utilizó otro DSE, *Ophiosphaerella* sp. (15-2) estudiado por

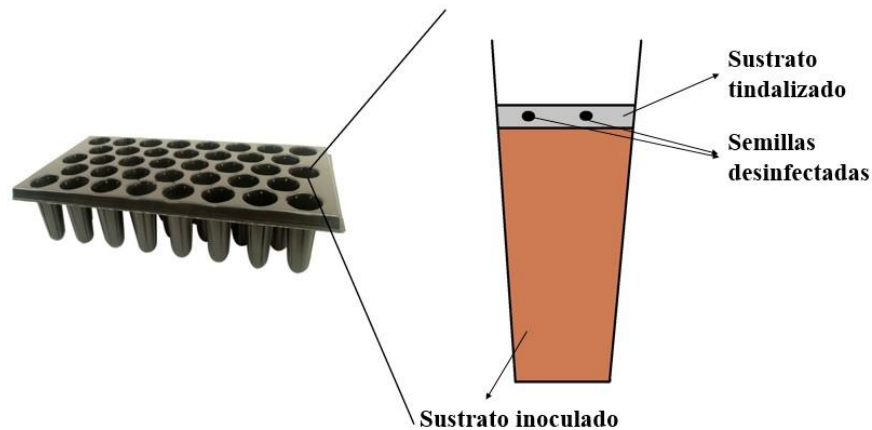
Spagnoletti et al. 2017, donde demostró tener un buen potencial solubilizador de fosfatos inorgánicos.

Se llevó a cabo un ensayo *in vivo* con sorgo, para lo cual se prepararon dos sustratos con suelo:vermiculita:arena (7:2:1), el cual fue tinalizado. Se utilizó un suelo ácido y otro alcalino. Una muestra compuesta de cada uno de estos sustratos tinalizados, fue analizada utilizando técnicas estándar (Sparks et al. 1996), determinándose carbono orgánico (Walkley y Black), nitrógeno total (Kjeldahl), pH (suelo:agua 1:2,5), conductividad eléctrica (suelo:agua 1:2,5) y P extractable (Bray y Kurtz).

Parte de este sustrato se reservó para su posterior inoculación. Para ello, cada sustrato tinalizado fue sembrado con los distintos hongos preseleccionados utilizando 10 discos de 5cm de cada micelio activo en 400g de sustrato estéril. Se agregó un volumen final de 50 mL de agua-malta y agua estéril a cada sustrato inoculado. Luego, las bolsas fueron almacenadas en la oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 días, agregando agua estéril cuando se lo consideró necesario y manteniendo, periódicamente, el micelio en contacto con la totalidad de la masa del sustrato.

Se prepararon bandejas de germinación de plantines (speedlings), previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% para cada tratamiento, a los cuales se les agregó el sustrato inoculado con cada tipo de hongo, según la figura 4.1:

Figura 4.1: Esquema de preparación de cada speedling para la germinación del sorgo con el agregado del sustrato inoculado con los distintos hongos DSE, solos o combinados con el inóculo comercial.



Las semillas de sorgo fueron desinfectadas sumergiéndolas en etanol al 70% durante 30 segundos, luego de eliminar el alcohol se trató con hipoclorito de sodio al 3% durante 60 segundos, finalmente se lavaron las mismas al menos cinco veces con abundante agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas sobre una pequeña capa de sustrato no inoculado para evitar el contacto directo con el hongo. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes, los factores a considerar fueron:

Hongos: *Alternaria alternata* (13-5), *Curvularia* sp. (G1B), *Ophiosphaerella* sp. (15-2) y

Hongo comercial (HC): se trata de un hongo de venta libre en Argentina.

Las cepas de cada hongo DSE mencionados se co-inocularon con el hongo comercial, resultando en tres tratamientos adicionales: HC/13-5, HC/G1B y HC/15-2 y el tratamiento control (sin el agregado de sustrato inoculado).

Suelos: El suelo ácido utilizado fue extraído del mismo lote, cercano a la ciudad de Junín, de donde se extrajo el suelo cultivado, mencionado en el capítulo 2. El suelo alcalino también fue extraído en las cercanías de la ciudad de Junín (Pcia. Buenos Aires). Se tomó el horizonte superficial, en un bajo no cultivado, cuyo suelo es un Natracualf Típico, de clase textural franco limosa (INTA 2018). Las principales características del suelo se indican en el cuadro 4.1.

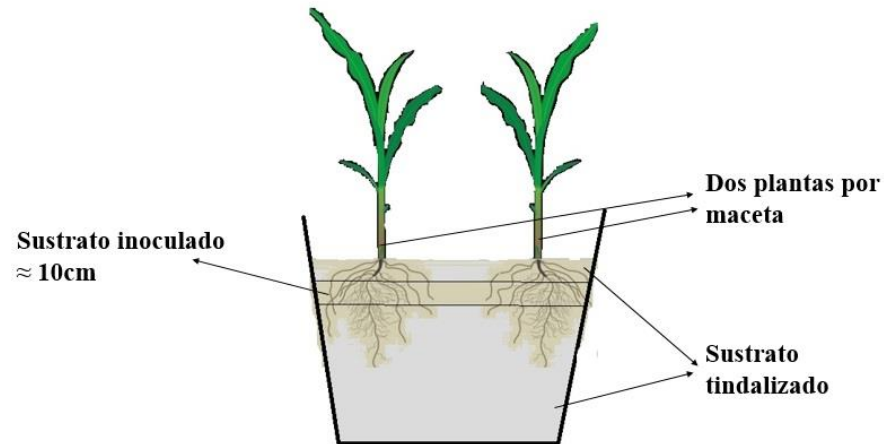
De la combinación de estos dos factores dio como resultado 8 tratamientos para cada experimento.

Cuadro 4.1. Características físico-químicas del perfil representativo del Natracualf integrante de la serie Rancagua (INTA 2018).

Horizontes	A	Ec	Btkn	Cn
Profundidad (cm)	0-24	24-30	30-60	130-160
Carbono Orgánico (%)	1,97	1,15	0,40	0,03
Nitrógeno total (%)	0,235	0,138	0,059	NA
Relación C/N	8	8	7	NA
Arcilla < 2 μ (%)	20,1	19,7	27,8	24,1
Limo 2-50 μ (%)	65,6	66,0	56,4	52,1
Arena 50-2000 μ (%)	14,3	14,3	14,2	23,8
pH en pasta	8,1	8,2	8,1	8,0
pH H₂O 1:2.5	8,5	8,6	8,9	8,8
Ca inter. meq./100g	8,6	8,4	NA	NA
Mg inter. meq./100g	2,8	2,4	NA	NA
Na inter. eq./100g	3,6	1,5	11,7	7,1
K inter. meq./100g	1,4	0,8	2,4	2,9
H inter. meq./100g	NA	NA	NA	NA
CIC meq./100g	18,4	14,7	21,8	21,0

Las macetas, con una capacidad de 2 litros, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, luego se rellenaron con sustrato estéril, aproximadamente 10cm de sustrato inoculado y, nuevamente, sustrato estéril, como indica la figura 4.2:

Figura 4.2: Esquema de preparación de macetas para el crecimiento de sorgo con los distintos tipos de sustrato (suelo ácido o alcalino)



Se hicieron pregerminar semillas de sorgo por un lapso de 8 días, transcurridos los cuales fueron trasplantadas a las macetas. Debido a razones de superficie disponible, climáticas y de capacidad de trabajo, el crecimiento del cultivo se realizó en el invernáculo de la Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes, durante 60 días, para los tratamientos con el suelo Hapludol (sustrato ácido). En cambio, en el caso del suelo Natracualf (sustrato alcalino), el crecimiento se llevó a cabo en una cámara de crecimiento del Instituto en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA - CONICET), durante 70 días, sometido a luz artificial durante 12h/día. La temperatura de la cámara se mantuvo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se trabajó por quintuplicado y triplicado, respectivamente.

Cada maceta se mantuvo en valores cercanos a la humedad de capacidad de campo, agregando agua de acuerdo al peso de la maceta. Para favorecer el crecimiento de las plantas,

se aplicaron alternativamente urea y KNO_3 a razón de 10mL de una solución de 1 mgL^{-1} , en promedio cada 2 días, en todos los tratamientos.

Pasado el tiempo indicado, las plantas fueron cortadas a nivel del cuello. La parte aérea fue pesada en húmedo, secada en estufa a 60°C y pesada hasta lograr un peso constante. Luego de la cosecha, se tomó una muestra compuesta de cada tratamiento, para proceder a la tinción y observación de raíces siguiendo la técnica de Philips y Hayman 1970. La biomasa radical extraída, también fue pesada y secada. En el material vegetal se determinó el P mediante el método de calcinación y determinación colorimétrica (Murphy y Riley 1962).

Los datos de biomasa aérea y radical, contenido de P en la biomasa aérea y radical y longitud radical con los hongos utilizados se analizaron estadísticamente, utilizando el software *RStudio* (versión 1.1.453 para Windows *RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>) para el análisis de un ANOVA. Para evaluar las diferencias entre las medias de tratamiento se usó la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0,05$).*

4.3 Resultados

Observación de raíces

No se observó presencia de hifas melanizadas y tabicadas ni de microesclerocios en ningún tratamiento. Se detectó la presencia de conidios pigmentados, septados, en la zona de la rizosfera para todos los tratamientos inoculados, indicando la presencia de hongos DSE como saprobios del suelo. En el tratamiento control no se observó presencia de hongos DSE.

Mediciones del sustrato

Las características iniciales de ambos sustratos tinalizados se muestran en el cuadro 4.2:

Cuadro 4.2.- Características analíticas¹ de los dos suelos estudiados.

Muestra	pH	C.E. (dS/m)	CO (%)	Nt (g/kg)	P (mg/kg)
Sustrato alcalino	9,01	0,373	1,57	0,24	7,69
Sustrato ácido	5,47	0,419	1,21	0,28	32,71

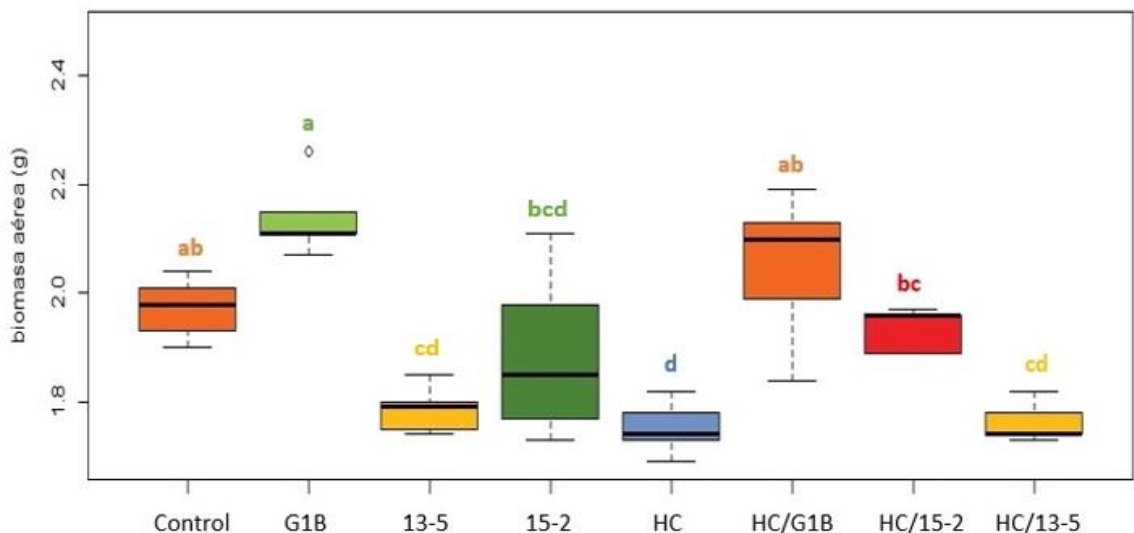
¹: Métodos indicados previamente.

Mediciones en la planta

En los cuadros 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7 se presentan los datos de biomasa aérea, biomasa radical, P en la biomasa aérea, P en la biomasa radical y longitud radical respectivamente, para los tratamientos llevados a cabo en el sustrato ácido:

En el cuadro 4.3 se observa que *Curvularia* sp. (G1B) y HC/G1B fueron los tratamientos que han registrado mayor biomasa. Sin embargo, estas no se han diferenciado significativamente del control. La menor biomasa se presentó con el tratamiento del hongo comercial, no siendo significativamente distinta con los tratamientos con *Alternaria alternata* (13-5) y HC/13-5 y *Ophiosphaerella* sp. (15-2), ver figura 4.3.

Figura 4.3: Boxplot de la biomasa aérea vs las distintas cepas de hongos estudiados en un sustrato preparado con el suelo ácido.



En el cuadro 4.4 se observa que la mayor biomasa radical se registró en el tratamiento control. *Ophiosphaerella* sp. (15-2) se destaca entre los hongos; *Curvularia* sp. (G1B) y las co-inoculaciones presentaron valores similares. El hongo comercial y *Alternaria alternata* (13-5) presentaron las menores biomásas.

En el cuadro 4.5 se observa que los tratamientos con los hongos *Curvularia* sp. (G1B), *Ophiosphaerella* sp. (15-2) y el Control fueron los tratamientos con mayor contenido de P en la biomasa aérea, *Alternaria alternata* (13-5), HC y las co-inoculaciones presentaron concentración de P similar.

En el cuadro 4.6 se observa que los tratamientos control, *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2) presentaron mayor contenido de P en la biomasa radical. Los tratamientos con co-inoculaciones, HC/G1B, HC/15-2 y *Alternaria alternata* (13-5), presentaron concentraciones similares. En cambio, los tratamientos HC/13-5 y HC fueron los menores valores de P obtenidos.

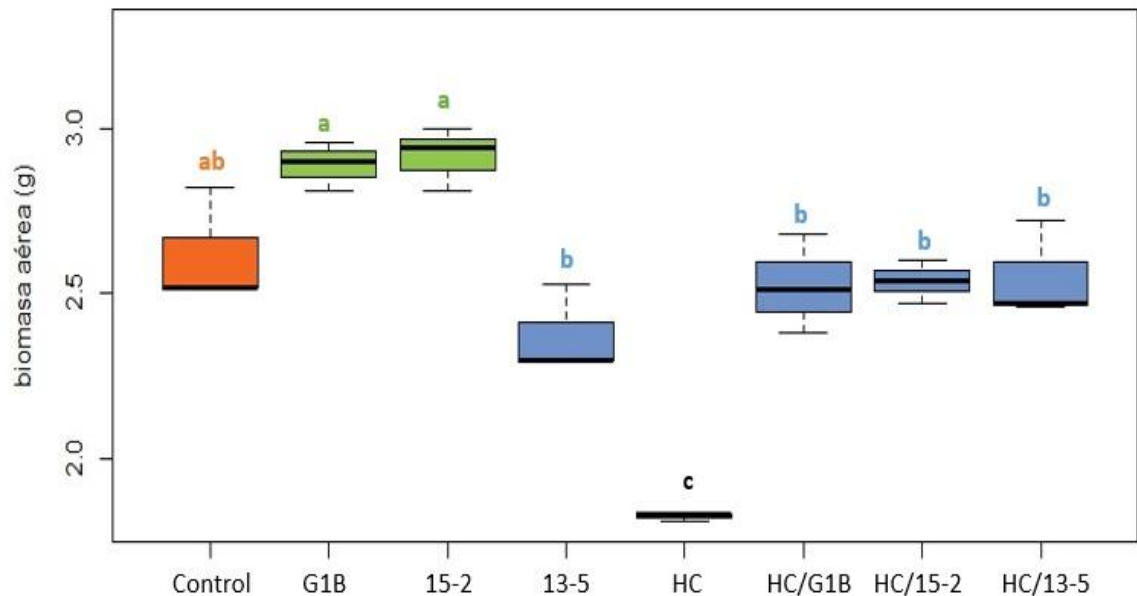
En el cuadro 4.7 se observa que la mayor longitud radical se presentó en el tratamiento con *Curvularia* sp. (G1B), mientras el hongo comercial fue el tratamiento con menor longitud radical.

En los cuadros 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12 se presentan los datos de biomasa aérea, biomasa radical, P en la biomasa aérea, P en la biomasa radical y longitud radical respectivamente, para los tratamientos en sustrato alcalino:

En el cuadro 4.8 se observa que las mayores biomásas aéreas se registraron con *Ophiosphaerella* sp. (15-2) y *Curvularia* sp. (G1B), aunque no fueron significativamente distintas con el tratamiento Control. Las biomásas de las co-inoculaciones y *Alternaria*

alternata (13-5) fueron similares. La menor biomasa se presentó en el tratamiento con el hongo comercial, ver figura 4.4.

Figura 4.4: Boxplot de la biomasa aérea vs las distintas cepas de hongos estudiados en un sustrato preparado con suelo alcalino.



En el cuadro 4.9 se observa que la mayor biomasa radical se registró en el tratamiento Control. Los tratamientos con los hongos *Curvularia* sp. (G1B), *Ophiosphaerella* sp. (15-2) y HC/13-5 presentaron un nivel menor de biomasa, siendo estas similares entre sí. Los tratamientos con los hongos *Alternaria alternata* (13-5), HC y HC/15-2 fueron las de menor biomasa.

En el cuadro 4.10 se observa que los mayores valores de P en la biomasa aérea se registraron en los tratamientos *Curvularia* sp (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2), sin embargo, estos no fueron significativamente distintos con los tratamientos Control, HC/G1B y HC/13-5. El

tratamiento que registró la menor concentración de P fue HC, siendo similar a *Alternaria alternata* (13-5) y HC/15-2.

En el cuadro 4.11 se observa que la mayor concentración se registró en el tratamiento control, sin embargo, esta no fue significativamente distinta con los tratamientos conteniendo los hongos *Curvularia* sp. (G1B), *Ophiosphaerella* sp. (15-2), *Alternaria alternata* (13-5), HC/G1B y HC/13-5. Los menores valores se registraron con HC y HC/15-2.

En el cuadro 4.12 se observa que los tratamientos que presentaron mayores longitudes radicales fueron *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2), siendo estas similares entre sí. Las menores fueron los tratamientos HC y HC/15-2.

Cuadro 4.3: Biomasa aérea expresado en g/maceta (MS) obtenida luego de 60 días de crecimiento en un sustrato utilizando suelo ácido.

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
1,97±0,05 ab	2,14±0,07 a	1,88±0,14 bcd	1,78±0,04 cd	1,75±0,04 d	2,05±0,12 ab	1,93±0,04 bc	1,76±0,03 cd

Cuadro 4.4: Biomasa radical en g/maceta (MS) obtenida luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
0,62±0,02 a	0,33±0,02 c	0,45±0,04 b	0,23±0,02 d	0,08±0,02 e	0,33±0,02 c	0,35±0,03 c	0,31±0,01 c

Cuadro 4.5: Concentración de P en la biomasa aérea en g/kg luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
3,72±0,12 a	3,97±0,19 a	3,69±0,16 a	2,50±0,91 b	1,63±0,19 c	2,34±0,31 bc	2,31±0,22 bc	1,78±0,21 c

Cuadro 4.6: Concentración de P en la biomasa radical en g/kg luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
3,18±0,16 a	3,12±0,26 a	3,13±0,22 a	2,09±0,42 b	0,91±0,23 d	1,75±0,21 b	1,59±0,25 bc	1,10±0,01 cd

Cuadro 4.7: Longitud radical en cm obtenida luego de 60 días de crecimiento en un sustrato con el suelo ácido

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
12,80±0,21 b	13,80±0,40 a	12,88±0,24 b	9,26±0,12 d	6,20±0,18 g	10,48±0,22 c	8,40±0,21 e	6,90±0,22 f

Cuadro 4.8: Biomasa aérea en g/maceta (MS) luego de 70 días de crecimiento en un sustrato con el suelo alcalino

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
2,62±0,14 ab	2,89±0,06 a	2,91±0,08 a	2,38±0,11 b	1,82±0,01 c	2,52±0,12 b	2,54±0,05 b	2,55±0,12 b

Cuadro 4.9: Biomasa radical en g/maceta (MS) luego de 70 días de crecimiento en un sustrato preparado con el suelo alcalino.

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
0,79±0,05 a	0,59±0,07 b	0,63±0,06 b	0,30±0,03 d	0,03±0,004 e	0,45±0,04 c	0,07±0,009 e	0,57±0,04 bc

Cuadro 4.10: Contenido de P en la biomasa aérea en g/kg luego de 70 días de crecimiento en un sustrato preparado con el suelo alcalino.

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
1,12±0,11 ab	1,62±0,37 a	1,57±0,39 a	0,43±0,17 bc	0,29±0,11 c	0,89±0,34 abc	0,43±0,13 bc	0,92±0,17 abc

Cuadro 4.11: Contenido de P en la biomasa radical en g/kg luego de 70 días de crecimiento en un sustrato preparado con el suelo alcalino.

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
0,73±0,14 a	0,61±0,21 abc	0,68±0,12 abc	0,44±0,11 abc	0,24±0,12 c	0,71±0,23 ab	0,27±0,11 bc	0,65±0,10 abc

Cuadro 4.12: Longitud radical en cm luego de 70 días de crecimiento en un sustrato preparado con el suelo alcalino.

Tratamientos							
Control	G1B	15-2	13-5	HC	HC/G1B	HC/15-2	HC/13-5
16,2±1,34 b	21,07±0,48 a	22,27±0,12 a	17,17±0,54 b	9,3±0,45 c	17,33±2,24 b	10,47±0,65 c	15,03±0,29 b

4.4 Discusión

En el presente capítulo, no se observó la presencia de estructuras endófitas en las raíces de sorgo, en los tratamientos con ambos sustratos, tanto el ácido como el alcalino, indicando que las especies de hongos utilizados no penetraron en las raíces del sorgo colonizando el parénquima cortical. Por lo tanto, se presume que los efectos producidos por los hongos DSE sobre el sorgo, tuvieron lugar en su forma saprófita en el suelo. Según Peterson et al. (2008) la interacción de los hongos endófitos de raíz ocurre de diferentes formas dependiendo de la planta y de las condiciones ambientales en donde ambos se desarrollan.

Los parámetros de crecimiento de las plantas que interactuaron con los hongos DSE son un indicador importante del efecto de los hongos en relación con la planta. Por ejemplo, Newsham 2011, en un meta-análisis, concluyó que la inoculación con DSE tuvo efectos positivos en la biomasa total aérea y radical en varias especies hospederas. Los incrementos en biomasa indicados en ese trabajo, fueron del orden de 45 y 71%, respectivamente, comparando con un control no inoculado. En esta tesis, la inoculación y co-inoculación con estos hongos, en el sustrato ácido, no tuvo un efecto significativo en la biomasa aérea, para la biomasa radical, ningún tratamiento superó al control. En cambio, en el caso de la longitud radical, *Curvularia* sp. (G1B) fue superior significativamente en relación con los restantes tratamientos. Esta diferencia entre la longitud de las raíces podría hipotetizarse debido a que probablemente algunos tratamientos dieron diámetros radicales menores (Wang et al. 2011), aunque esto no fue comprobado en este estudio.

En el sustrato alcalino, se observaron resultados parcialmente distintos. *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2) y el Control presentaron la mayor biomasa aérea. Otros hongos y las co-inoculaciones tuvieron efecto negativo sobre la misma. La biomasa radical presentó un comportamiento similar al sustrato ácido.

La inoculación con el hongo comercial fue la que presentó los menores valores de biomasa aérea y radical y longitud radical. Este efecto negativo del hongo comercial, pudo deberse a que la dosis utilizada para la inoculación del sustrato podría haber resultado excesiva y, consecuentemente se generó un efecto patogénico, negativo para la planta. La co-inoculación disminuyó el posible efecto patogénico del hongo comercial (Khastini et al. 2012).

En esta tesis, el efecto de los hongos fue relativamente similar en los sustratos con ambos suelos, y las diferencias en biomasa aérea y radical pudo deberse simplemente al hecho que los experimentos en los sustratos con suelo ácido y alcalino se llevaron a cabo en condiciones ambientales diferentes.

En los dos sustratos la absorción de P en los distintos tratamientos se correlacionó con los resultados obtenidos en la biomasa. El contenido de P encontrado en la planta, en el tratamiento con sustrato alcalino fue menor al del sustrato ácido, esto podría deberse a que la concentración de P disponible fue mayor en este sustrato (Bielecki 1973). En el sustrato ácido, los tratamientos Control, *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2) resultaron ser los que presentaron mayor absorción de P en la biomasa aérea y radical. El contenido de P en la biomasa aérea fue mayor también en los tratamientos Control, *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2). Sin embargo, en la biomasa radical fue difícil observar diferencias significativas debido a la gran variabilidad en los resultados. También se puede atribuir a la poca cantidad de repeticiones por tratamiento.

4.5 Conclusiones preliminares

Los hongos *Curvularia* sp. (G1B) y *Ophiosphaerella* sp. (15-2), en ambos sustratos, fueron los hongos que presentaron los mejores resultados, aunque en la mayoría de los parámetros del sorgo, no se diferenciaron del tratamiento Control. En cambio, los hongos *Alternaria*

alternata (13-5) y el hongo comercial (HC) presentaron los valores más bajos, rechazándose así la hipótesis planteada. La co-inoculación de los DSE con el hongo comercial, en ambos sustratos se presentó por lo general, negativa para el crecimiento del sorgo, aunque este efecto negativo fue menor al tratamiento con el hongo comercial sin DSE en algunos parámetros.

CAPITULO 5

Conclusión Final

El P es un elemento importante en la producción agrícola, y la intervención de hongos solubilizadores de fósforo parece ser una estrategia para mejorar la disponibilidad de este elemento en el suelo. De esta manera, puede contribuir a tener efectos económicos positivos y, además, ayudar a conservar el medio ambiente. Sin embargo, este proceso de solubilización de P es muy complejo, dependiente de varios factores. En primer lugar, los cultivos responden de forma diferente frente la acción de los microorganismos y estos a su vez, son dependientes de la temperatura del suelo, humedad, pH, salinidad, fuente de nutrientes en el suelo y su relación con el resto de la microbiota. Por lo tanto, es crucial estudiar la respuesta de los hongos DSE solubilizadores de P, ante estos factores antes de poder desarrollar un producto como un biofertilizante.

En el capítulo 2, se ha demostrado, en una situación puntual de la región pampeana, que la agricultura sin reposición de nutrientes produjo un efecto de agotamiento global del P y ha modificado la proporción de sus fracciones del suelo. La hipótesis en este capítulo, fue validada parcialmente debido a que el P unido al Al y Fe aumentaron en concentración absoluta y relativa, lo que demuestra que las fracciones de P residual y P orgánico contribuyeron con este aumento.

Estos fenómenos pueden significar una modificación de la fuente de P desde donde los microorganismos disuelven el nutriente. Estos son temas poco explorados y serán necesarios estudios adicionales, considerando, por ejemplo, diferente grado de agotamiento de los suelos.

En el capítulo 3, se ha evaluado el efecto de los hongos DSE sobre las diferentes fracciones inorgánicas del suelo. *Setosphaeria rostrata* (G1A) presentó el mejor rendimiento en solubilizar todas las fracciones inorgánicas de P, validando la hipótesis planteada. Sin embargo, son necesarios estudios sobre las fracciones del P orgánico del suelo ya que podría

proveer mayor información acerca del efecto de los distintos hongos DSE mencionados, sobre la dinámica del P en el suelo.

Finalmente, se estudió la posible mejora de la disponibilidad de P para cultivos como el sorgo, mediante el uso de hongos DSE solubilizadores de P. La hipótesis planteada en este capítulo no fue validada debido a que la respuesta fue diferente entre el hongo comercial y los hongos DSE. Una tarea posible para desarrollar en el futuro es llevar el cultivo a etapa de grano, para asegurar el eventual efecto de hongos DSE solubilizadores de P sobre la producción sustentable del cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Aciego Pietri, J.C. y Brookes, P.C. (2009). Substrate inputs and pH as factors controlling microbial biomass: activity and community structure in an arable soil. *Soil Biol. Biochem.* 41:1396-1405.
- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. y Rashid, M. (2002). In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agric. Biol.* 4:454-458.
- Álvarez, R. (2001). Estimation of carbon losses by cultivation from soils of the Argentine Pampa using the Century Model. *Soil Use and Management* 17: 62-66.
- Álvarez, C.R. y Rubio G. (2010). Ácido: parámetros e influencia sobre los cultivos y manejo. In: Álvarez, R. et al Fertilidad de suelos. Caracterización y manejo en la región pampeana, EFA, Buenos Aires.
- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H. y Yang, Y. (2012). The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. *PLoS ONE*, 7(10), e47968.
- Barreira, E.A. y López Domínguez, H. (1970). Fósforo ligado al aluminio, hierro y calcio en perfiles de suelos de la región pampeana húmeda. *Revista de Investigaciones Agropecuarias.* 7: 127-132.
- Barrow, J.R. y Osuna, P. (2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *J. Arid Environ.* 51:449-459.
- Beck, M.A. y Sánchez, P.A. (1994). Soil phosphorus fraction dynamics during 18 years of cultivation on a typic Paleudult. *Soil Sci.* 34:1424-1431.

- Beauchamp, V.B., Stromberg, J.C. y Stutz, J.C. (2005). Interactions between *Tamarix ramosissima* (saltcedar), *Populus fremontii* (cottonwood), and mycorrhizal fungi: effects on seedling growth and plant species coexistence. *Plant and Soil* 275:221-231.
- Belesky, D.P. y Malinowski, D.P. (2000). Abiotic stresses and morphological plasticity and chemical adaptations of *Neotyphodium*-infected tall fescue plants. In: Bacon, C.W. & White, J.F. (Eds), *Microbial Endophytes* 455–484.
- Bethlenfalvay, G.J., Schreiner, R.P., Mihara, K.L. (1997). Mycorrhizal fungi effects on nutrient composition and yield of soybean seed. *Journal of Plant Nutrition* 20:581-591.
- Bieleski, R. L. (1973). Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 225–252.
- Cardoso, I.M. y Kuyper, T.W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116:72-84.
- Cavagnaro, T.R., Bender, S.F., Asghari, H. R. y Heijden, M.G.A. (2015). The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends in Plant Science*, 20:283–290.
- Chang, S.C. y Jackson, M.L. (1957). Fractionation of soil phosphorus. *Soil Science* 9: 109–119.
- Chien, S.H., Prochnow, L.I. y Cantarella, H. (2009). Recent developments of fertilizer productions and use to increase nutrient efficiency and minimize environmental impacts. *Adv. Agron.* 102:261-316.
- Chuang, C.C., Kuo, Y.L., Chao, C.C. y Chao W.L. (2007). Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol. Fertil. Soils* 43:575-584.
- Conti, M.E., Barberis, L.A. y Chamorro, E.R. (1977). Estado del fósforo en suelos de Entre Ríos, Buenos Aires y Santa Fe. *IDIA* 33: 135-139.

- Condon, L.M., Turner B.L. y Cade-Menun, B.J. (2005). Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In Sims J.T., Sharpley A.N., eds, Phosphorus: Agriculture and the Environment. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, 87-121.
- Costa, M.G., Gama-Rodrigues, A.C., Gonçalves, J.L.M., Gama-Rodrigues, E.F., Sales, M.V.S. y Aleixo, S. (2016). Labile and non-labile fractions of phosphorus and its transformations in soil under *Eucalyptus* plantations, Brazil. *Forests* 2016: 1–15.
- Cruzate, G.A. y Casas, R.R. (2017). Balance de nutrientes en los suelos agrícolas de la Argentina en la campaña 2015/16 14 *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica* 28: 14-23.
- Culot, P.H. y Bolaño, A. (1970). Estudio del estado del fósforo en los suelos del Sudeste Bonaerense. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 7: 251-260.
- Currah, R.S., Tsuneda, A., Murakami, S. (1993). Morphology and ecology of *Phialocephala fortinii* in roots of *Rhododendron brachycarpum*. *Canadian Journal of Botany* 71:1639–1644
- Darwich, N. (1980). Niveles de fósforo asimilables en los suelos pampeanos. *Actas IX Reunión Argentina de Ciencias del Suelo*. Paraná, Entre Ríos.
- Deubel, A. y Merbach, W. (2005). Influence of soil microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In Varma A., Buscot F. (Eds) *Microorganisms in soils: role in genesis and functions*. *Soil Biology*, vol 3.
- Dighton, J. (2007). Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. In: Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (Eds), *Environmental and Microbial Relationships*. Second Edition. *The Mycota*. 287-300

- Duggan, M. y Rodríguez, M. (2016). La fertilidad de los suelos en relación con la edafogénesis. In: Pereyra, F.X. y Duggan, M. (Eds), Suelos y Geología Argentina. Asociación Argentina de Ciencias del Suelo. 288-312.
- Food and Agricultural Organization of United Nations (FAO). (2014). <http://faostat.fao.org/site/535/DesktopDefault.aspx?PageID=535#ancor> 27 de junio de 2019.
- Fernández López, C., Mendoza, R. y Vázquez, S. (2006). Fracciones de fósforo en suelos de Corrientes con producción citrícola, arrocería y pastoril. *Ciencia del suelo* 24: 161-168.
- Follett, R.F., Stewart, J.W.B. y Cole, C.V. (1987). Soil Fertility and Organic Matter as Critical Components of Production Systems. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America Special Publication 19, Madison, WI.
- Gowariker, V., Krishnamurthy, V.N., Gowariker, K., Dhanorkar, M. y Paranjape, K. (2009). The fertilizer encyclopedia. 271.
- Guo, F., Yost, R.S., Hue, N.V., Evensen, C.I. y Silva, J.A. (2000). Changes in Phosphorus Fractions in Soils under Intensive Plant Growth. *Soil Science Society and America Journal* 64: 1681-1689.
- Hansen, J.C., Cade-Menun, B.J. y Strawn, D.G. (2004). Phosphorus speciation in manure-amended alkaline soils. *Journal of Environment Quality* 33: 1521-1527.
- Harrison, A.F. (1987). Soil organic phosphorus – A review of world literature. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 257.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. y Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60: 579–598.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B. y Chauhan, B.S. (1982). Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Science Society and America Journal* 46: 970–976.

Hulbert, S.H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, 54: 187-211.

INTA. (2018). <https://inta.gob.ar/unidades/213000/cartografia-genesis-y-evaluacion-de-tierras>.

Jain, R., Saxena, J. y Sharma, V. (2010). The evaluation of free en encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *App. Soil Ecol.* 46:90-94.

Jumpponen, A. y Trappe, J.M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140:295-310.

Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes—are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11:207–211.

Khastini, R.O., Hiroyuki, O., y Narizawa, K. (2012). The role of Dark Septate Endophytic Fungus, *Veronaeopsis simplex* Y34, in *Fusarium* Disease suppression in Chinese cabbage. *Journal of Microbiology* 50:618-624.

Kucey, R.M.N. y Leggett, M.E. (1989). Increased yields and phosphorus uptake by Westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated with a phosphate-solubilizing isolate of *Penicillium bilaji*. *Canadian Journal of Soil Science* 69:425-432.

Lavado, R.S. y Taboada, M.A. (2011). Génesis y propiedades de los suelos halomórficos. En Taleisnik, E. y R.S. Lavado (Ed). *Ambientes salinos y alcalinos de la Argentina: recursos y aprovechamiento productivo*. 9-27. FCA-UCC y OGE. Buenos Aires.

Lavado, R.S., y Taboada, M.A. (2009). The Argentinean Pampas: A key region with a negative nutrient balance and soil degradation needs better nutrient management and conservation programs to sustain its future viability as a world agresource. *Journal of Soil and Water Conservation* 64: 150-153.

- Lewis, D.H. (1987). Evolutionary aspects of mutualistic associations between fungi and photosynthetic organisms. In: Rayner ADM, Brasier CM, Moore D (eds) Evolutionary biology of fungi. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 161– 178.
- Li-qin, W., Ya-li, L., Zhi-xia, M., Juan, Ch., y Shun, X.G. (2010). The promoting role of an isolate of dark-septate fungus on its host plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. *Mycorrhiza* 20:127–135
- LoBuglio, K.F., Berbee, M.L., y Taylor, J.W. (1996). Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among the ascomycetes. *Mol Phylogenet Evol* 6:287–294.
- Mandyam, K., Fox, C. y Jumpponen, A. (2012). Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza* 22:109-119.
- Mandyam, K. y Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol.* 53:173-189.
- McLean, E.O. (1976). Chemistry of soil aluminum. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 7: 619-636.
- Mehta, S., Nautiyal, C.S. (2001). An efficient Method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43:51-56.
- Michelena, R.O., Urrutia, C.B., Pittaluga, A., Vavruska, F., y Sardi, M.E.B. (1988). Degradación de los suelos en el sector norte de la Pampa Ondulada. *Ciencia del Suelo* 6: 60-66.
- Murphy, J. y Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27:31–36.
- Narsian, V. y Patel, H.H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32:559-565.

- Newsham, K.K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190:783–793.
- O’Dell, T.E., Massicotte, H.B. y Trappe, J.M. (1993). Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. *New Phytologist* 124:93–100.
- Pandey, A., Das, N., Kumar, B., Rinu, K., Trivedi, P. (2008). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J. Microbiol. Biotech.* 24:97-102.
- Peterson, R.L., Wagg, C., y Paulter, M. (2008). Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function? *Botany*, 86 :445-446.
- Philips, J.M., y Hayman, D.S., (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pierzynski, G.M., McDowell, R.W., y Sims, J.T., (2005). Chemistry, Cycling, and Potential Movement of Inorganic Phosphorus in Soils In: Sims, J. T. & A. N. Sharpley (editors). *Phosphorus: Agriculture and the Environment*, Agronomy Monograph no. 46 American Society of Agronomy, Madison, WI. 53-86.
- Pittaro, G., Ruolo, S., Torres, E., Luna, F., y Taleisnik, E. (2019). Tolerancia a Salinidad en Híbridos de Sorgo Forrajero. *Actas VI RAS*.
- Prystupa, P., Duggan, M. y Ferraris, G. (2012). Fuentes y formas de aplicación de azufre y micronutrientes en la Región Pampeana. In: Álvarez, R., Prystupa, P., Ródriguez, M. y Álvarez, C. (Eds), *Fertilización de cultivos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana*, Editorial de Facultad de Agronomía (UBA).

- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 321:305-339.
- Richardson, A.E. y Simpson, R.J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*. 156:989-996.
- Rinu, K. y Pandey, A. (2010). Temperature-dependent phosphate solubilization by cold- and pH-tolerant species of *Aspergillus* isolated from Himalayan Soil. *Mycoscience* 51:263-271.
- Rodríguez, M.B. (2016). Los fertilizantes y sus características. In: Lavado, R.S. (Ed), *Sustentabilidad de los sistemas y uso de los fertilizantes*. Edición AACs, FERTILIZAR y ORGE. Buenos Aires. 40-59.
- Rubio, G., Pereyra F.X., y Taboada, M.A. (2018). Pampean region. In Rubio, G., Pereyra F.X., Lavado R.S., (Ed.). *Soils of Argentina*. World Soils Book Series (Editor A.E. Hartemink). Springer International Publishing AG, New York. 81-100.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D.L. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 527–560
- Seeling, B., Zasoski, R.J. (1993). Microbial effects in maintaining organic and inorganic solution phosphorus concentrations in a grassland topsoil. *Plant Soil* 148: 277–284.
- Selosse, M.A., Baudoin, E. y Vandenkoorhuysse, P. (2004). Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327:639–648.
- Scervino, J.M., Gottlieb, V.A., Silvani, M., Pégola, L., y Fernández, A.M. (2009). Exudates of Dark Septate Endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil biology & Biochemistry* 41:1753-1756.
- Sims, J.T. y Kleiman, P.J.A. (2005). Managing Agricultural Phosphorus for Environmental Protection. In: Sims, J. T. & A. N. Sharpley (editors). *Phosphorus: Agriculture and the*

Environment, Agronomy Monograph no. 46 American Society of Agronomy, Madison, WI. 1021-1068.

Sharpley, A.N. y Smith, S.J. (1985). Fractionation of inorganic and organic phosphorus in virgin and cultivated soils. *Soil Science Society and America Journal*. 49:127–130.

Shen, J., Li, H., Neumann, G. y Zhang, F. (2005). Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Science* 168:837–845.

Schulz, B. y Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109:661–686.

Smith, S.E. y Smith, F.A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:16.1-16.24.

Spagnoletti F.N., Tobar, N.E., Fernandez Di Pardo, A., Chiocchio, V.M. y Lavado, R.S. (2017). Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Appl. Soil Ecol.* 111:25-32

Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., y Loeppert, R.H. (1996). *Methods of Soil Analysis Part 3-Chemical Methods*. Soil Science Society and America Book Series 5.3., Madison, WI.

Stoyke, G., Currah, R.S. (1993). Resynthesis in pure culture of a common subalpine fungus–root association using *Phialocephala fortinii* and *Menziesia ferruginea* (Ericaceae). *Arctic and Alpine Research* 25:89–193.

Surono, y Narisawa, K. (2018). The inhibitory role of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* against *Fusarium* disease on the *Asparagus officinalis* growth in organic source conditions. *Biological Control*, 121:159–167.

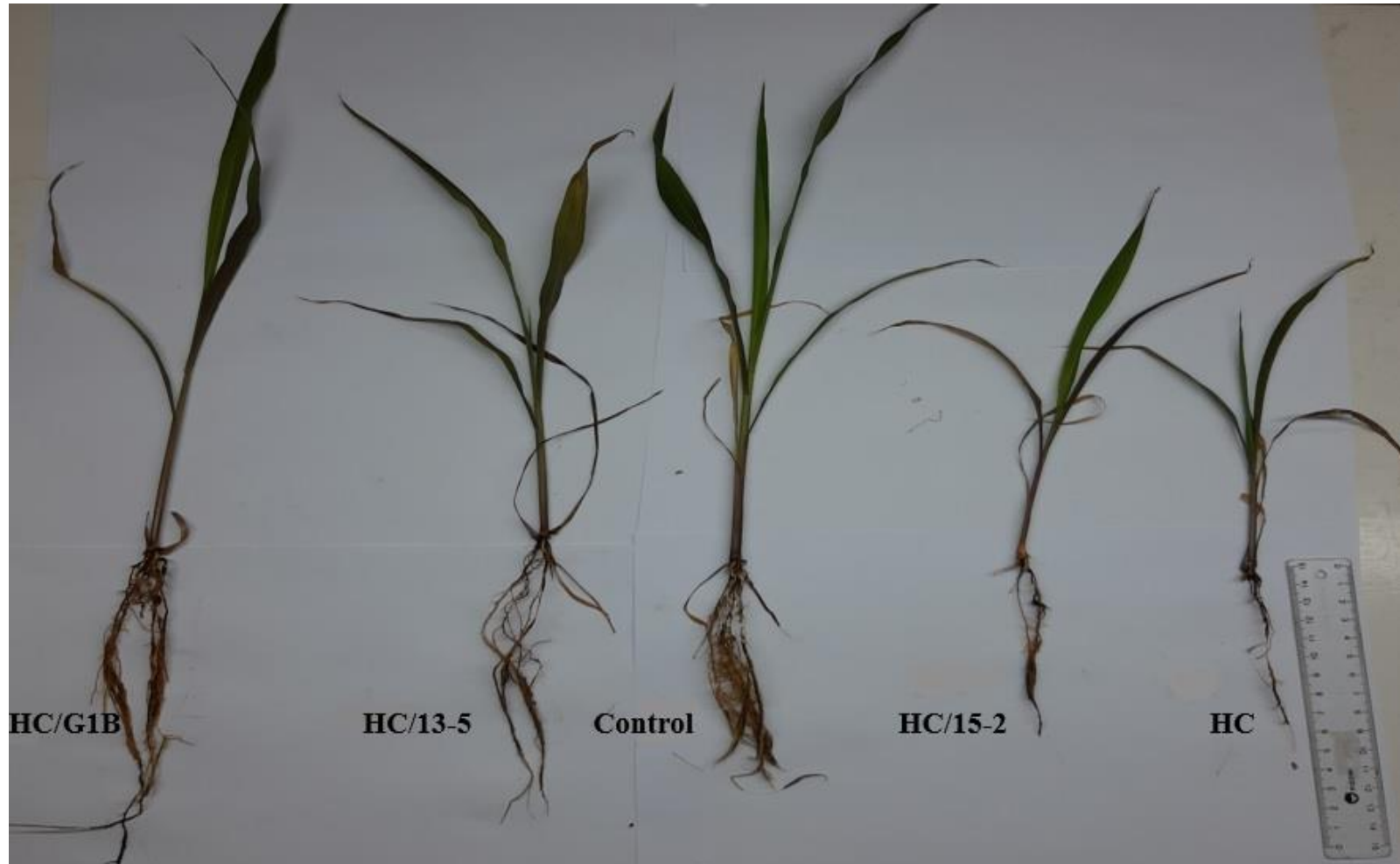
- Taboada, M.A., Damiano, F. y Lavado, R.S. (2011). Suelos afectados por sales e inundaciones en la Pampa Deprimida y el Oeste Bonaerense. En Taleisnik, E. y R.S. Lavado (Ed). Ambientes salinos y alcalinos de la Argentina: recursos y aprovechamiento productivo. 55-88. FCA-UCC y OGE. Buenos Aires.
- Tarafdar, J.C. y Rao, A.V. (1996). Contribution of *Aspergillus* strains in acquisition of phosphorus of wheat (*Triticum aestivum* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* L.) grown in a loamy sand soil. *Appl. Soil Ecol.* 3:109-114.
- Thomas, G.V. (1985). Occurrence and ability of phosphate solubilizing fungi from coconut plant soils. *Plant Soil* 87:357-364.
- Tiessen, H., Stewart, J.W.B. y Moir, J.O. (1983). Changes in organic and inorganic phosphorus composition of two grassland soils and their particle size fractions during 60-90 years of cultivation. *Journal of Soil Science*, 34:815–823.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. y Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898):671–677.
- Treu, R., Laursen, G.A., Stephenson, S.L., Landolt, J.C. y Densmore, R. (1996). Mycorrhizae from Denali National Park and Preserve, Alaska. *Mycorrhiza* 6:21–29.
- Turner, B.L. y Richardson A.E. (2004). Identification of scyllo-Inositol phosphates in soil by Solution Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal* 68:802-808.
- Turner, B.L., Newman, S., Cheesman, A.W. y Reddy K.R. (2007). Sample pretreatment and phosphorus speciation in wetlands soils. *Soil Science Society of America Journal* 71:1538-1546.
- Urricariet, A.S., y Lavado, R.S. (1999). Indicadores de deterioro en suelos de la Pampa Ondulada. *Ciencia del Suelo* 17:37-44.

- Usuki, F. y Narisawa, K. (2007). A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* 99:175-184.
- Vázquez, M.E., Nollemeyer, E., y Coremberg, P. (1991). The dynamics of different organic and inorganic phosphorus fractions in soils from the south of Santa Fe province, Argentina. *Communication Soil Science and Plant Analysis* 22:1151-1164.
- Vergara, C., Araujo, K.E.C., Urquiaga, S., Schultz, N., Balieiro, F.C., Medeiros, P.S., Santos, L.A., Xavier, G.R., y Zilli, J.E. (2017). Dark Septate Endophytic Fungi Help Tomato to Acquire Nutrients from Ground Plant Material. *Front. Microbiol.* 8:2437.
- Verma, S., Subehia, S.K, y Sharma, S.P. (2005). Phosphorus fractions in an acid soil continuously fertilized with mineral and organic fertilizers. *Biology and Fertility of Soils* 41: 295–300.
- Wang, X., Qiang, P., Fengxian, Ch., Xiaolong, Y. y Hon, L. (2011). Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*, 21: 173-181.
- Weishampel, P.A. y Bedford, B. (2006). Wetlands dicots and monocots differ in colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza* 16:495-502.
- Wang, C.J.K. y Wilcox, H.E. (1985). New species of ectendomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phialophora ftlandia*, *Chloridium paucisporum*, and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia* 77: 951-958.
- Whitelaw, M.A., Harden, T.J. y Helayar, K.R. (1999). Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil. Biol. Biochem.* 31:655-665.

- Xiao, C., Chi, R., He, H., Qiu, G., Wang, D. y Zhang, W. (2009). Isolation of phosphate solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159:330-342.
- Yu, T.E., Egger, K.N., y Peterson, R.L. (2001) Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Can. J. Microbiol.* 47:741-753.
- Zhang, Q., Gong, M., Yuan, J., Hou, Y., Zhang, H., Wang, Y., y Hou, X., (2017). Dark septate endophyte improves drought tolerance in sorghum. *Int. J. Agric. Biol.*, 19: 53-60.
- Zubillaga, M.S. y Lavado, R.S. (2016). Contaminación física y química del suelo debido al uso de fertilizantes. En *Sustentabilidad de los agrosistemas y uso de fertilizantes*. AACCS, FERTILIZAR y O Gráfica E. Buenos Aires, 121-139.

ANEXO

TRATAMIENTOS EN SUSTRATO ALCALINO



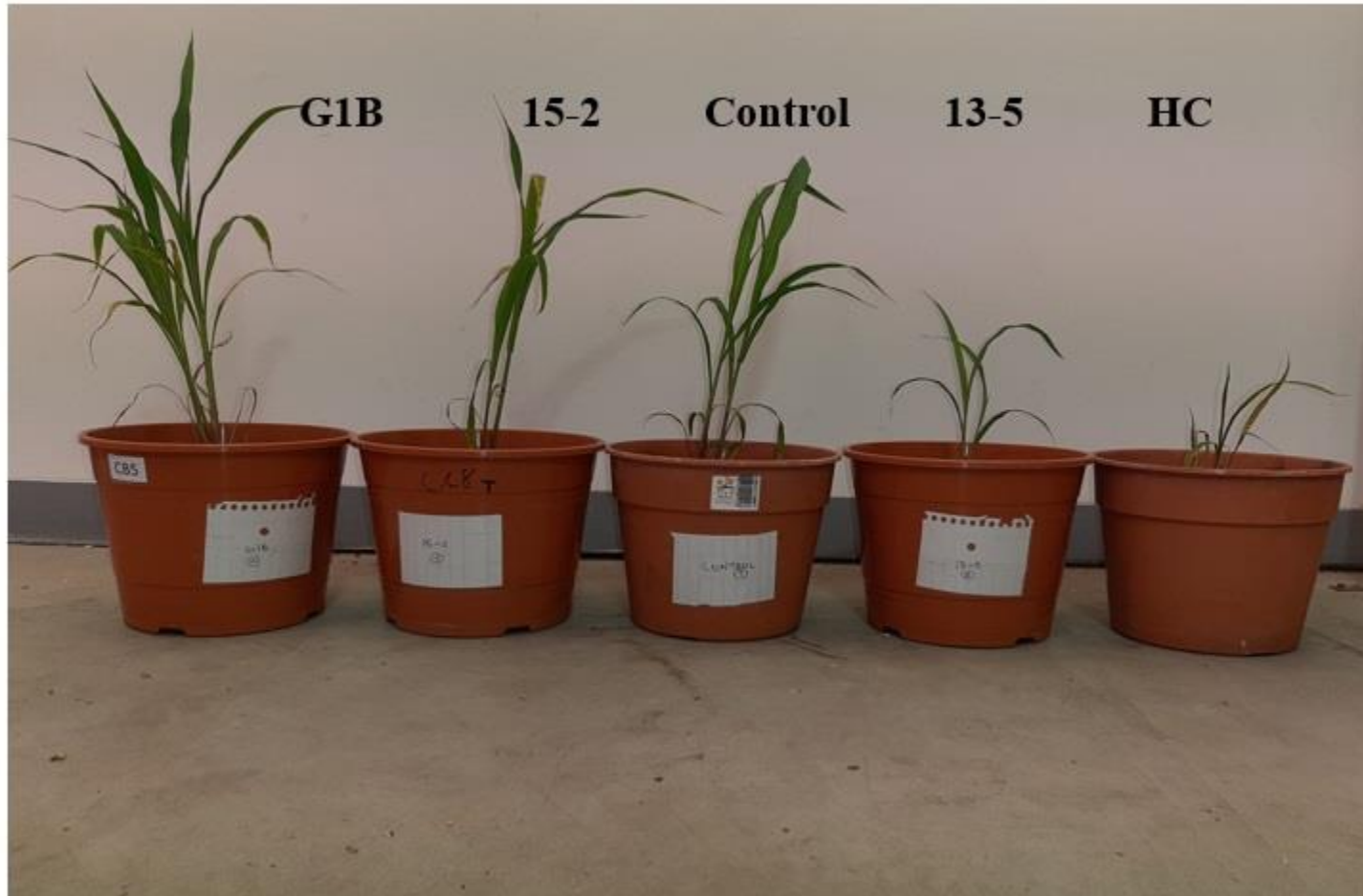
Plantas de sorgo representando los distintos tratamientos, en sustrato preparado con suelo alcalino luego de 70 días de crecimiento. Se pueden observar las diferentes longitudes radicales.



Plantas de sorgo representando los distintos tratamientos en sustrato preparado con suelo alcalino luego de 70 días de crecimiento, se pueden observar las diferentes longitudes radicales.

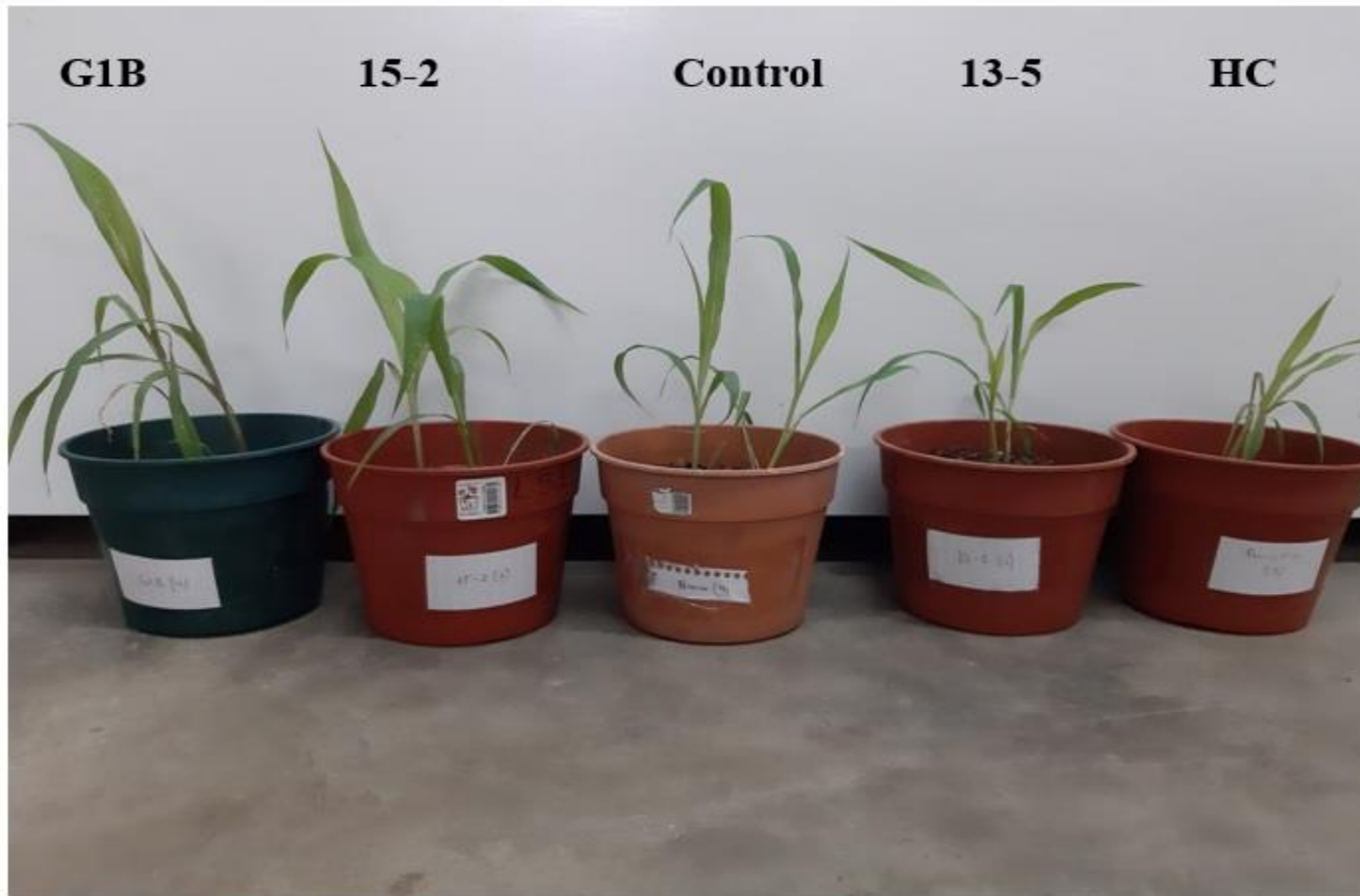


Plantas de sorgo representando los tratamientos 15-2 vs control, en sustrato preparado con suelo alcalino luego de 70 días de crecimiento. Se puede apreciar las diferentes longitudes radicales.



Macetas con plantas de sorgo. De derecha a izquierda: HC, 13-5, Control, 15-2 y G1B. Se observa las diferencias en altura de vástago en los distintos tratamientos.

TRATAMIENTOS EN SUSTRATO ÁCIDO



Macetas con plantas de sorgo. De derecha a izquierda: HC, 13-5, Control, 15-2 y G1B. Se observa las diferencias en altura de vástago en los distintos tratamientos.



Macetas con plantas de sorgo. De derecha a izquierda: HC/13-5, HC/15-2, HC/G1B y Control. Se observa las diferencias entre tratamientos.