UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Alternativas biotecnológicas para mejorar el suministro de fósforo en el cultivo del café

Hernán González Osorio

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de biociencias
Medellín, Colombia
2018

Alternativas biotecnológicas para mejorar el suministro de fósforo en el cultivo del café

Hernán González Osorio

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Director (a):

Ph.D., Nelson Walter Osorio Vega

Ingeniero Agrónomo Ph.D.

Grupo de Investigación:

Microbiología del suelo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de biociencias

Medellín, Colombia

Agradecimientos

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos que hicieron posible alcanzar este sueño de manera particular a las siguientes personas e instituciones:

- A mi familia por el apoyo incondiconal y la paciencia.
- Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Doctorado en Biotecnología.
- Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias)
- A los caificultores del páis, a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia Centro Nacional de Investigaciones de Café – Cenicafé y al equipo de Investigación de la Disciplina Suelos.
- Dres. Nelson Wálter Osorio Vega y su familia; Carmenza E. Góngora Botero y su equipo de trabajo, Rubén D. Medina R., Laura Osorno B, Siavosh Sadeghian K, Patricia Marín G. Fernando Farfán V., José Raúl Rendón S., Natalia Bermudes F.
- Purdue University – Department of Agronomy. Dr. Darell Schulze.
- Soluciones Microbianas del Trópico – SMT. Dra. Patricia Vélez.
- Dres. Elke J. Brand Nogueira C., Juan Carlos García L. y Carlos A. Ángel C.
- Gloria L. Rivas R., Nelly Pulgarín H., Ing. Catalina Grisales.
- Grupo de investigación Microbiología – Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Resumen

Con el objetivo de desarrollar alternativas de tipo biotecnológico tendientes al mejoramiento de la eficiencia en la fertilización con fósforo (P) en el cultivo de café, se llevaron a cabo cinco experimentos en los cuales se evaluaron: a) la capacidad de fijación de P en suelos contrastantes en su génesis y fertilidad; b) la solubilización de P por parte de hongos (HSP) aislados a partir de diferentes suelos obtenidos de zonas cafeteras de Colombia y los mecanismos que explican dicho fenómeno; c) el crecimiento y la absorción de P en plánta de café inoculadas con un hongo formador de micorriza arbucular; d) el efecto en el desarrollo y la absorción de P por plantas jóvenes de café en respuesta al suministro de HSP y e) la posibilidad de sustituir la actual recomendación fosfórica en plantas jóvenes de café a partir del suministro de HSP. El potencial de fijación de P, expresado como la cantidad del elemento requerida para alcanzar 0.2 mg L^{-1} en la solución del suelo ($P_{0.2}$), estuvo entre 36 y 691 mg L^{-1} siendo la materia orgánica, el porcentaje de arenas y el contenido de aluminio soluble (o intercambiable) las variables que mejor explicaron el fenómeno. La abundancia relativa de HSP fue mayor en los suelos con mayor fijación de P y más alto contenido de materia orgánica. Los mecanismos asociados la solubilización de P fue la disminución del pH y la producción de ácidos orgánicos. Por otro lado, las plantas jóvenes de café respondieron a la inoculación del hongo micorrizal *Rizoglomus fasciculatum*, el efecto dependió de la concentración de P en la solución del suelo, siendo éste mejor con 0.02 mg L^{-1}. Del mismo modo, se encontró que al inocular el suelo con el HSP *Phlebia subserialis*- (cepa CH4), se mejoró significativamente el crecimiento y la absorción de P por plantas de café, particularmente con niveles de P en la solución del suelo de 0.04 a 0.07 mg L^{-1} (que corresponden con niveles de P por método Bray II de 7-10 mg kg^{-1}); por encima de estas concentraciones no hubo promoción de crecimiento ni de absorción de P por las plantas. Finalmente, se demostró que en la etapa de almácigo la inoculación con el HSP *Phlebia subserialis* (cepa CH4) puede sustituir o complementar la fertilización con fertilizante fosfórico soluble o roca fosfórica.

Palabras clave: Microbiología de suelos, zona cafetera, café, *Coffea arabica.*, Hongos formadores de micorrizas, hongos solubilizadores de fosfato.

Abstract

In order to develop biotechnological alternatives to improve phosphorus (P) fertilization efficiency in coffee growing, this study carried out five experiments to evaluate the following: a) The capability of P fixation of different soils according their genesis and fertility; b) The solubilization of P by isolated fungi (HSP) from Colombian coffee-growing soils and the mechanisms that explain this phenomenon; c) The growth and P uptake of coffee young plants inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus (AMF); d) The growth and P uptake of coffee young plants in response to a HSP application, and e) The possibility of substituting or complementing the current phosphoric recommendation in coffee nursery plants by using HSP. The results showed the P fixation potential, which was expressed as the P quantity required to obtain 0.2 mg L^{-1} in soil solution ($P_{0.2}$), and varied from 36 to 691 mg L^{-1}, as the level of organic matter, sand content, and aluminum exchange in the soils, explaining this phenomenon. A major relative abundance of HSP was found in soils where the organic matter and P fixation were high. On the other hand, the AMF *Rizoglomus fasciculatum* promoted growth and P uptake in coffee young plants, mainly when P concentration in the soil solution was 0.02 mg L^{-1}. In the same way, soil inoculated by HSP *Phlebia subserialis*- (strain CH4), improved growth and P uptake of coffee plants when P concentrationin the soil solution was between 0.04 to 0.07 mg L^{-1} (this level corresponds to 7 to 10 mg kg^{-1} according to P-Bray II method). Finally, it was demonstrated that P fertilization with phosphoric rock or phosphoric soluble fertilizer can be substituted or complemented by application of *Phlebia subserialis* (strain CH4) fungus.

Keywords: Soil microbiology, Coffee Zone, *Coffea arabica*, arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-*solubilizing fungus*

Contenido

Pág.

1. Introducción 13
1.1 Antecedentes 13
1.2 Problema 13
1.3 Justificación 14

2. Capítulo 1. Estado del arte 15
2.1 El fósforo en la agricultura 15
2.2 Alternativas para incrementar la eficiencia en el uso del P 18
2.2.1 Solubilización de P a partir del metabolismo de las plantas y los microorganismos 18
2.3 Fuentes naturales de P 21
2.4 Situación mundial del mercado de los fertilizantes que contienen P 23
2.5 Requerimientos de P por el cafeto 25
2.6 Microorganismos solubilizadores de P 26
2.6.1 Hongos micorrizico- arbusculares (HMA) en la eficiencia en el crecimiento de las plantas 29
2.6.2 HMA en la absorción de P y el crecimiento del café 31
2.6.3 Rhizoglomus fasciculatum 33
2.7 Bibliografia 34

3. Capítulo 2. Capacidad de fijación de fosfato en suelos de la zona cafetera Colombiana 47
3.1 Resumen 47
3.2 Introducción 48
3.3 Materiales y métodos 50
3.3.1 Sitio 50
3.3.2 Suelos 50
3.3.3 Isotermas de adsorción de P 52
3.4 Resultados y discusión 54
3.4.1 Tiempo de incubación 54
3.4.2 Isotermas de adsorción 56
3.4.3 P en solución vs. P Bray II 63
3.4.4 Implicaciones de los resultados 66
3.5 Bibliografía 66

4. Capítulo 3. Aislamiento de hongos y evaluación de su capacidad para solubilizar fosfato 70
4.1 Resumen 70

4.2 Introducción 71
4.3 Materiales y métodos 73
4.3.1 Aislamiento 74
4.3.2 Determinación de Ácidos orgánicos (AO) 75
4.3.3 Determinación de la especie de los HSP 76
4.3.4 Recuento de hongos totales y de HSP 77
4.3.5 Análisis de la información 77
4.4 Resultados y discusión 78
4.4.1 Identificación de colonias de hongos con capacidad de solubilización de P .. 78
4.4.2 Determinación de Ácidos orgánicos (AO) 83
4.4.3 Evaluación del crecimiento de HSP 86
4.4.4 Determinación de género y especie mediante secuenciación de ITS 1 y 2 del ADN ribosomal de los HSP seleccionados 88
4.4.5 Asociación entre la abundancia de HSP y la capacidad de fijación del suelo 89
4.5 Implicaciones de los resultados 92
4.6 Bibiografía 92

5. Capítulo 4. Plant phosphorus uptake and growth promotion of coffee seedlings by inoculation of a mycorrhizal fungus at different levels of phosphorus in soil's solution 99
5.1 Resumen (Abstract) 99
5.2 Introduction 100
5.3 Materials and methods 101
5.4 Results 103
5.5 Discussion 107
5.6 References 109

6. Capitulo 5. Efecto de la aplicación de HSP y el nivel de fósforo en solución, en el crecimiento de almácigos de café 115
6.1 Resumen 115
6.2 Introducción 116
6.3 Materiales y métodos 118
6.4 Resultados 121
6.4.1 Efecto de la aplicación de HSP y el nivel de P en solución del suelo sobre el crecimiento de plantas jóvenes de café en el suelo de unidad Timbío. 121
6.4.2 Comparación de la respuesta de plantas de café a la aplicación de P con fertilizante soluble, una fuente de P de baja solubilidad y la inoculación con el hongo *Phlebia subserialis* (cepa CH4). 125
6.5 Discusión 127
6.6 Implicaciones de los resultados 130
6.7 Bibliografía 131

7. Conclusiones y Recomendaciones 135

Lista de figuras

..... Pág.

Figura 2-1. Probable desplazamiento de fosfatos fijados en las superficies de óxidos e hidróxidos de Fe por ácidos orgánicos producidos por microorganismos (Osorio, 2005).19
Figura 2-2. Ejemplo de formación de quelatos por ácido cítrico (Sylvia *et al*. 1999). 20
Figura 3-1. Concentración de P en solución en función del tiempo de incubación luego de la aplicación de una solución de KH_2PO_4 a razón de 1000 mg kg^{-1}. Las barras indican error estándar. 55
Figura 3-2. Relación entre el P aplicado y el P en solución, para el grupo de suelos de unidades derivadas de cenizas volcánicas. 57
Figura 3-3. Relación entre el P aplicado y el P en solución para las unidades de suelos derivadas de material parental diferente a cenizas volcánicas 60
Figura 3-4. Correlación entre el P en solución y el determinado por Bray II para los suelos objeto de estudio 64
Figura 4-1. Concentración final de P en solución (mg L^{-1}) en función de la inoculación con cepas de HSP aislados de cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia (CH: Chinchiná, QU: Quindio y TI: Timbio). Se incluyó como referencia un tratamiento no inoculado (Control) y un hongo de referencia (*P. lilacinus*). Las barras indican error estándar. Asterisco indica promedios diferentes del *P. lilacinus* según prueba Dunnett (P<0.0001). 79
Figura 4-2. pH de la solución final en función de la inoculación con cepas de HSP aislados de cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia (CH: Chinchiná, QU: Quindio y TI: Timbio). Se incluyó como referencia un tratamiento no inoculado (Control) y un hongo de referencia (*P. lilacinus*.). Las barras indican error estándar. Asterisco indica promedios diferentes del *P. lilacinus*. según prueba Dunnett (P<0.0001). 81
Figura 4-3. Concentración de P en solución en función del pH final obtenido 10 días después del crecimiento de hongos en el medio específico para HSP. Los hongos corresponden a cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia (CH: Chinchina, Ti: Timbío, QU: Quindío,). 82
Figura 4-4. Identificación por HPLC de tipos y concentración de AO producidos por los nueve aislamientos constrastantes de HSP seleccionados a partir de cuatro suelos de la zona central cafetera de Colombia (CH: Chinchiná, QU: Quindío y Ti: Timbío). 84

Figura 4-5. Diámetro de colonias fungosas en función del tiempo de incubación luego de inocular el medio con cinco aislamientos de HSP obtenidos de cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia. Barras verticales indican intervalos de confianza al 5 %. . 87
Figura 4-6. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos totales y de HSP en los suelos objeto de estudio. Barras verticales indican error estándar. 90
Figura 4-7. Abundancia relativa de HSP en los suelos objeto de estudio. Letras no comunes indican diferencia estadística de acuerdo con prueba Duncan ($P < 0.0001$) 90
Figure 5-1. Mycorrhizal colonization percentage in *C. arabica* cv. Colombia plants grown in a soil with inoculated AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in the soil solution. Bars represent standard error. 104
Figure 5-2. Shoot dry weight (SDW) of coffee *C. arabica* cv. Colombia young plants or seedlings grown in a soil inoculated with AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in soil solution. Bars represent standard error. 105
Figure 5-3. Foliar P concentration (%) in leaf discs of coffee *C. arabica* cv. Colombia plants grown in a soil inoculated with AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in soil solution. Bars represent standard error. 106
Figure 5-4. Foliar P content (µg/ leaf disc) of coffee *C. arabica* cv. Colombia plants grown in a soil inoculated with AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in soil solution. Bars represent standard error 107
Figura 6-1. Masa seca aérea y contenido de P total absorbido en la parte aérea de plantas de café *C. arabica* cv. Tabi en función de la inoculación con dos hongos solubilizadores de fósforo (*P. ubiquetum* y *P. subserialis*), a tres niveles de P en el suelo de la unidad Timbío. Letras minúsculas no comunes indican diferencia significativa entre tratamientos mediante la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$), para cada nivel de P en la solución del suelo. Barras verticales indican error estándar. 124
Figura 6-2 (A-B). Crecimiento de plantas de café cv. Tabi y absorción de P, efecto de la aplicación de P con fertilizante soluble, un fertilizante de baja solubilidad y la inoculación con el hongo solubilizador *P. subserialis-CH20*. Barras verticales indican error estándar. Letras no comunes representan diferencia estadística según prueba Duncan al 5%. ... 126

Lista de tablas

..... Pág.

Tabla 2-1. Capacidad de fijación de P en mg kg^{-1}, por diferentes suelos de acuerdo a su composición mineralógica predominante (Juo y Fox, 1977). 17
Tabla 3-1. Localización y tipo de suelos objetos de estudio. 51
Tabla 3-2. Propiedades físicas y químicas de los suelos bajo estudio. 52
Tabla 3-3. Clasificación de los suelos de acuerdo a la cantidad de P requerida para alcanzar la concentración $P_{0.2}$ en solución. 56
Tabla 3-4. Coeficientes de la función calculada para los suelos objeto de estudio. 61
Tabla 3-5. Fijación relativa de la concentración de P aplicado de acuerdo al nivel $P_{0.2}$ en los suelos evaluados en comparación para el suelo de Líbano (100%). 62
Tabla 3-6. Modelos de regresión para la estimación del nivel de P en solución a partir del método Bray II. 65
Tabla 4-1. Clasificación de los suelos seleccionados con relación a la cantidad de P que es necesario aplicar, para alcanzar el nivel de $P_{0.2}$ en la solución del suelo. 73
Tabla 4-2. Identificación más probable de los cuatro HSP seleccionados para el estudio. 88
Table 5-1. Statistical significant P-values from the analysis of variance tests for P foliar concentration in coffee plants. NS: not significant. 105
Tabla 6-1. Características químicas del suelo seleccionado en función de la cantidad de P necesario para alcanzar el nivel de $P_{0.2}$ en la solución del suelo y sus características químicas. 118
Tabla 6-2. Descripción de los tratamientos, cantidad de P en solución y su equivalente en la metodología Bray II. 119
Tabla 6-3. Niveles de significancia del análisis de varianza para las variables estudiadas. 121

1. Introducción

1.1 Antecedentes

El fósforo (P) es uno de los elementos de mayor requerimiento por la planta de café en su estado jóven y durante la fase de crecimiento vegetativo. Pese al reconocido potencial que presentan los suelos de la zona cafetera colombiana en sus componentes físicos, químicos y biológicos, en muchos de ellos son evidentes los bajos niveles de disponibilidad de este nutriente, dada la alta capacidad para retenerlo en formas no aprovechables por las raíces del cultivo; circunstancia que conduce a que se deban aplicar fertilizantes fosfóricos solubles como el fosfato di-amónico, en promedio 250 kg/ha, durante los primeros 24 meses de desarrollo del cultivo (Sadeghian y González, 2012; Sadeghian, 2008).

1.2 Problema

En Colombia casi el 100% del fertilizante fosfórico soluble (fosfato di-amoníco DAP, o mono-amónico MAP) que se consume es importado, circunstancia que permite afirmar que las actividades agrícolas destinadas a la producción de alimentos y materias primas, presentan un alto potencial de vulnerabilidad por la dependencia misma que hay por estos insumos y por la volatilidad en sus precios, tanto local como internacionalmente. Sobre este último aspecto, resulta oportuno aclarar que a partir de 2008 el precio de venta al consumidor de fertilizante DAP ya registraba incrementos hasta del 355% en sólo 18 meses, siendo la principal causa, la cotización internacional del petróleo.

La roca fosfórica (RP) es la materia prima para la fabricación de los fertilizantes en mención, por ende, se ha constituido en un insumo estratégico para la producción de alimentos en muchas naciones del mundo. Como consecuencia de lo mencionado, ante el incremento significativo en la demanda de fertilizantes fosfóricos proyectado a partir de 2017, se prevé una disminución en la disponibilidad de las materias primas. Estos aspectos en su conjunto, permiten concluir que el panorama de reducción de los costos de producción a través del uso de fertilizantes fosfóricos de uso tradicional en la caficultura de Colombia, sería todo un desafío. Sumado a esto, es bien sabido que en un ambiente diverso en suelos como el que se presenta en la zona cafetera colombiana, la fijación de P en los suelos es ampliamente variable, lo cual conduce a que la aplicación del elemento basada en las actuales recomendaciones generales pueda resultar en muchos casos excesiva o insuficiente.

1.3 Justificación

Conscientes de la problemática que se discute, en la actualidad se plantean algunas alternativas biotecnológicas para mejorar el suministro de P, tal es el caso de hongos micorrizales que tienen la capacidad para adquirir el P que se encuentra fuera del alcance de las raíces de las plantas y de hongos solubilizadores de fosfato (HSP), los cuales a través de su metabolismo secretan ácidos orgánicos o sus bases conjugadas a través de las cuales se puede hacer disponible el elemento fijado en el suelo. Específicamente para el cultivo del café en Colombia, la primera alternativa se ha centrado en el mejoramiento de estado nutricional general, prevención del ataque de patógenos y manejo de enfermedades; en tanto que con HSP es poca la evidencia experimental con la que se cuenta en la cual se relacione su efectividad en diferentes condiciones de suelo.

Por lo discutido anteriormente en el presente trabajo, desarrollado a través de cinco experimentos, se efectuó una aproximación conducente a generar estrategias para mejorar la eficiencia en la nutrición de café con P a través del uso de hongos formadores de micorrizas y de HSP obtenidos a través de metodologías de baja complejidad aplicables a las condiciones de suelos de la zona cafetera colombiana.

2. Capítulo 1. Estado del arte

2.1 El fósforo en la agricultura

El fósforo (P) juega un importante papel en la nutrición de las plantas puesto que es requerido para múltiples funciones metabólicas como la fotosíntesis, la respiración, la producción de semillas y el crecimiento radical entre otros aspectos (Chrysargyris *et al.*, 2016). Su concentración en los suelos varía, según el método de determinación, entre 0,7 y 65% (Jalali y Jalali, 2016), y puede hallarse en cuatro formas generales: (i) en los minerales (fluorapatita, variscita y fosfato dicálcico o tricálcico), (ii) en la solución del suelo, (iii) adsorbido sobre la superficie de los coloides inorgánicos, y (iv) como un componente de la materia orgánica (Zhu *et al.,* 2018; Romanyá *et al.*, 2017). La cantidad, forma y dinámica del elemento están condicionadas por la combinación de factores físicos, químicos y biológicos, que a su vez dependen de la mineralogía del suelo y de las características de humedad y temperatura del mismo (Condron *et al.,* 2005).

De acuerdo con Osorio (2005), los mecanismos de fijación de P por las superficies arcillosas del suelo se basan en dos componentes: (i) una adsorción no específica consistente en la atracción electrostática que ejercen las cargas positivas de la superficie de los minerales (ejemplo, óxidos e hidróxidos de Fe y Al) y (ii) una adsorción de tipo específica mediante la cual se produce sustitución de grupos OH^- por grupos $H_2PO_4^-$ en la superficie de los minerales arcillosos.

En la agricultura del trópico la fijación de P constituye uno de los principales limitantes, particularmente en suelos altamente meteorizados (Roy *et al.*, 2017; Fox, 1974) y en los derivados de cenizas volcánicas (Velásquez *et al.*, 2017; Shoji y Takahashi, 2002; Fox,

1974), en donde la presencia de iones de aluminio y de hierro (Osorio, 2005; Hall y Baker, 1971) y de complejos humus-minerales (hidróxidos de hierro y de aluminio, alofana, ferhidrita y goetita) fijan o retienen elevadas cantidades de P e impiden el abastecimiento para las raíces (Huang *et al.* 2016*,* Ige *et al*., 2007). En tales condiciones, pueden encontrarse suelos con alta concentración de P total (Bunemann, 2015), pero con muy baja cantidad en forma aprovechable (Mengel y Kirkby, 2000).

El término P aprovechable indica la fracción que puede ser tomada por las plantas, normalmente se evalúa midiendo la concentración del elemento en la solución y la capacidad del suelo para mantener abastecido dicho medio (capacidad tampón). En general, se estima que una concentración de P en solución del suelo de 0.2 mg L^{-1} (medida a partir de un extracto de suelo con agua ó 0.01 M de $CaCl_2$ en proporción 1:10) es suficiente para obtener un máximo rendimiento en diversos cultivos (Juo y Fox, 1977). Dicho valor puede variar considerablemente de acuerdo con la sensibilidad de las especies vegetales; por ejemplo, para maíz y sorgo éste es 0.06 mg L^{-1}, mientras que para otros cultivos la concentración debe estar alrededor de 0.1 y 0.4 mg L^{-1} Fox y Kamprath (1970). Las cantidades en mención, pueden ser variable según la génesis del suelo y su mineralogía (Fink *et al.* 2016; Juo y Fox, 1977). Sobre el particular, los estudios de isotermas de adsorción de P han sido una valiosa herramienta de análisis de los requerimientos de diversos cultivos que crecen en distintos tipos de suelos (Fox y Kamprath, 1970).

En general, una categorización de suelos de acuerdo con la mineralogía que posean, puede brindar aproximaciones en lo que respecta a la predicción de cantidades de P requeridas para alcanzar el citado nivel, tal como se exhibe en la Tabla 2-1 y que corresponde a la propuesta según Juo y Fox (1977).

Tabla 2-1. Capacidad de fijación de P en mg kg^{-1}, por diferentes suelos de acuerdo a su composición mineralógica predominante (Juo y Fox, 1977).

Categoría	$P_{0.2}$ (mg kg^{-1})*	Mineralogía predominante
Muy baja	< 10	Materiales orgánicos, cuarzo, cenizas poco evolucionadas
Baja	10 – 100	Arcillas 2:1, cuarzo, arcillas 1:1
Media	100 – 500	Arcillas 1:1 con óxidos
Alta	500 – 1000	Óxidos y ceniza moderadamente evolucionada
Muy alta	> 1000	Materiales amorfos desilicatados

*Cantidad requerida para obtener en solución 0.2 mg L^{-1} de solución de suelo.

En investigaciones adelantadas en Cenicafé por López (1960), se halló un alto poder de fijación de P por la fracción orgánica en suelos de la Unidad Chinchiná (entre 1500 y 3000 mg kg^{-1}). Bravo y Gómez (1974) obtuvieron resultados similares en suelos de génesis volcánica pertenecientes a las unidades de suelos Fresno, Chinchiná, Montenegro, Fondesa, Quindío y Malabar, en donde las cantidades de P fijadas correspondieron a 1900, 1800, 1300, 1200, 1100 y 600 mg kg^{-1}, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo expresado por Fox (1974), quien encontró que el poder de fijación de las cenizas volcánicas aumenta conforme éstas incrementan la superficie específica de estos materiales, aspecto que puede relacionarse con el grado de evolución de las mismas.

En Colombia, alrededor del 40% del área cultivada en café se encuentra en suelos derivados de cenizas volcánicas (González, 2013). Adicional a ello, existen áreas como las de la zona cafetera del piedemonte llanero en donde es característico encontrar suelos muy meteorizados en los cuales predominan los óxidos e hidróxidos de hiero (Fe) y de Aluminio (Al) que también pueden fijar mucho P (FNC, 1992). En estos suelos normalmente se requiere aplicar altas cantidades de fertilizantes fosfatados; no obstante, parte del P aplicado es fijado por el suelo y en consecuencia la efectividad de la fertilización es baja (<20%) (Sharma *et al.*, 2013; Ramírez y Osorio, 2005). Por lo anterior, es importante buscar alternativas de manejo de suelos que aumenten la eficiencia de la fertilización.

2.2 Alternativas para incrementar la eficiencia en el uso del P

Una adecuada nutrición de la planta está determinada en buena medida por la concentración de iones que rodea la raíz. Sin embargo, para el caso específico del P es importante resaltar que la utilización de fertilizantes hidrosolubles no siempre garantiza el abastecimiento de P para cubrir las necesidades del cultivo, especialmente en suelos con alto capacidad para fijar el elemento (McLean y Logan, 1970). Bajo estas circunstancias, alternativas que apunten a la implementación de diferentes métodos de aplicación del fertilizante (Antunes *et al.* 2007), la utilización de enmiendas o de materiales fosfóricos de baja solubilidad como la roca fosfórica, puede conducir a incrementar la eficiencia en la fertilización con P. Sin embargo, es de resaltar que aun así, los fertilizantes fosfóricos siguen siendo de un alto valor comercial y las enmiendas que se mencionan, se restringen a suelos con problemas de acidez. Esta situación permite establecer que opciones tales como la asociación con hongos formadores de micorriza (Cardoso y Kuyper, 2006), promover el uso de ácidos orgánicos (Ramírez y Osorio, 2005) y utilizar microorganismos solubilizadores de P en combinación con la roca fosfórica (RP) pueden constituir herramientas efectivas de bajo costo (Osorio y Habte, 2014). Además de su amplio espectro de uso en sistemas tradicionales o en sistemas de producción donde el uso de fertilizantes químicos es restringido (Chiputwa *et al.* 2015).

2.2.1 Solubilización de P a partir del metabolismo de las plantas y los microorganismos

Los exudados de raíces de las plantas y los microorganismos pueden contribuir a disolver el P inorgánico que se encuentra fijado en el suelo. Dicha función es ejercida por los ácidos orgánicos de bajo peso molecular que son generados a partir del metabolismo de la glucosa vía respiración oxidativa o fermentación (Acevedo *et al.* 2014; Haq *et al.* 2003). Este proceso puede también disolver el P-mineral del suelo o el aplicado como RP (Osorio y Osorno, 2014; Hinsinger y Gilkes, 1997).

El mecanismo de acción se asocia principalmente con la excreción de protones que se produce cuando se asimilan iones como el amonio (Zhang *et al.*, 2004). Además, los aniones orgánicos pueden favorecer la disolución a través de la formación de complejos con el calcio (p.e., citrato-Ca). Los aniones orgánicos como succinato (Khan *et al.,* 2014), gluconato (Oliveira *et al.,* 2014), acetato, formato, lactato, (Yadav *et al.*, 2013), malato y oxalato (Haq *et al.*, 2003) pueden competir con los aniones fosfato adsorbidos en la superficie de los minerales arcillosos tal como se ilustra en la Figura 2-1. Esto puede darse particularmente con los fosfatos retenidos electrostáticamente (adsorción no específica) y se sospecha que ocurra con aquellos adsorbidos en la superficie de los coloides (adsorción específica).

Ramírez y Osorio (2005) encontraron que en Andisoles de Antioquia los aniones citrato y oxalato redujeron la adorción de fosfato.

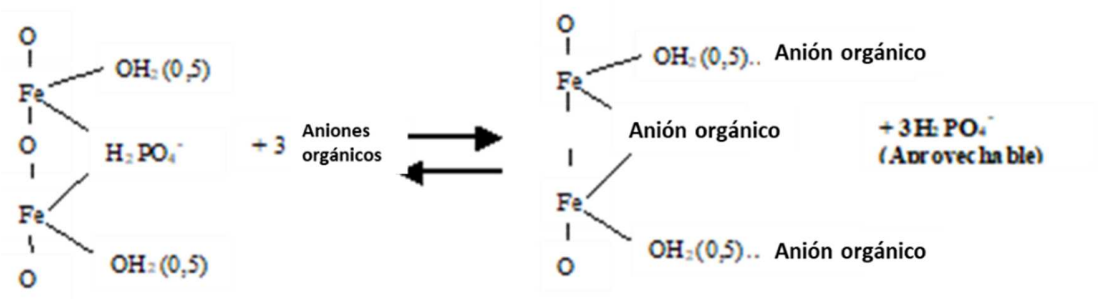


Figura 2-1. Probable desplazamiento de fosfatos fijados en las superficies de óxidos e hidróxidos de Fe por ácidos orgánicos producidos por microorganismos (Osorio, 2005).

Los ácidos orgánicos pueden también actuar como agentes formadores de complejos (quelatos) y liberar el P precipitado con Al, Fe y Ca (Lin *et al.* 2017; Li *et al.*, 2006) (Figura 2-2).

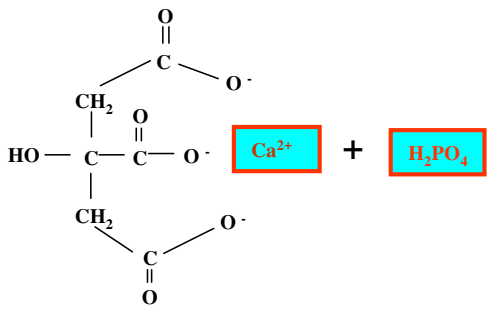


Figura 2-2. Ejemplo de formación de quelatos por ácido cítrico (Sylvia *et al.* 1999).

Estas sustancias, aunque tienen una existencia transitoria en la solución del suelo, pueden abundar durante periodos de intensa actividad biológica. De esta manera, es posible tener altas concentraciones localizadas en las zonas favorables para el crecimiento de microorganismos, tales como los sitios de descomposición de restos orgánicos y en la rizosfera (Zapata, 2006).

Lo anterior indica que la utilización de fuentes fosfóricas de bajo costo y solubilidad pueden ser efectivas para suministrar el nutriente a las plantas, en la medida de que se apliquen en un medio ácido o simplemente al proporcionarle tanto protones (H^+) como agentes quelatantes de Ca^{2+} (Osorio, 2011).

Bajo el criterio de la acidez mencionado en el párrafo anterior, la ecuación 1 descrita por Guerrero (1983), muestra la reacción química básica que ocurre durante la fabricación del fertilizante de alta solubilidad, comercialmente conocido como Súper fosfato triple (SPT), cuya materia prima esencial es la roca fosfórica. La ecuación 2 sugerida por Hinsinger y Gilkes (1997) indica la reacción que puede tener dicho material al ser sometido a acidulación (Belboom *et al.*, 2015; Al-Thyabat and Zhang, 2015).

$$Ca_{10}(PO_4)_6F_2 + 12H^+ + H_3PO_4 + 10H_2O \leftrightarrows 10Ca^{2+} + (H_2PO_4)_2 + 2F^- \quad (1)$$

$$Ca_{10}(PO_4)_6F_2 + 12H^+ \leftrightarrows 10Ca^{2+} + 6H_2PO_4^- + 2F^- \quad (2)$$

De acuerdo con lo mencionado, la acidez, sumada a la producción de ácidos orgánicos que conduzca a quelatar el catión que acompaña al P en los minerales fosfóricos y la disminución en el pH, puede hacer soluble el P requerido por las plantas como lo han demostrado investigaciones de Osorio, (2011). Esto sugiere el uso conjunto de materiales fosfatados de bajo costo como la roca fosfórica con organismos solubilizadores de P puede contribuir a disminuir el uso de fertilizantes fosfóricos de alto precio disponibles comercialmente (Katiyar y Goel, 2003).

2.3 Fuentes naturales de P

Los minerales que contienen P hacen parte principalmente de las rocas ígneas y sedimentarias, aproximadamente el 80% de la producción mundial proviene de estas últimas. Las rocas fosfóricas constituyen la base en la fabricación de prácticamente todos fertilizantes fosfatados y dependiendo de su origen difieren en su mineralogía, textura y características químicas. De acuerdo con Stewart *et al.* (2005), todos los continentes del planeta tienen depósitos de P a excepción de la Antártida. Los mismos autores sostienen que el hecho que haya depósito natural no necesariamente implica que se cuente con la cantidad y calidad suficiente de P para que sea económicamente factible su aprovechamiento.

El término roca fosfórica se utiliza para designar los materiales litológicos cuyo nivel de P_2O_5 es superior al 20%. Los fosfatos allí contenidos son altamente insolubles y deben ser tratados, tal como se mencionó anteriormente, con diferentes agentes para que el P quede en forma soluble (Matta *et al.* 2017) y por consiguiente, fácilmente disponible para las plantas. Las reservas mundiales se estiman en 11250 millones de toneladas respaldadas

por una base mundial en 34045 millones de toneladas repartida en Marruecos, Sahara Occidental, Estados Unidos y Colombia. Recientemente, se han registrado más yacimientos de Marruecos y Sahara, China, Estados Unidos y Suráfrica, como los de mayor proyección respecto a las minas del resto del mundo (Konhauser *et al*., 2007).

En Colombia los depósitos más grandes que actualmente son aprovechados corresponden a fosforitas marinas localizadas en la cordillera occidental, también en la Oriental y la parte sur de la Central, su ubicación más precisa es Sardinata en el departamento de Norte de Santander (> 30% de P_2O_5), Pesca e Iza (Boyacá) y Tesalia en el Huila (>20% de P_2O_5), y algunas minas en otros municipios de Santander (Camacho, 2002).

Stewart *et al.* (2005) sostienen que aunque es muy difícil predecir la vida útil de estos depósitos naturales, se han efectuado algunas proyecciones de acuerdo al consumo de fertilizantes y la demanda de alimento por efectos del crecimiento de la población. Los modelos que explican el fenómeno, asumen la no-reposición de los minerales que se extraen; uno de ellos realizado en 1990 estimó que las reservas de “RP fácilmente minable” existentes en dicha época que actualmente coinciden con los mayores productores de roca fosfórica del mundo, se agotarán en el año 2090 (Stewart *et al.,* 2015). Otros autores como Wendling *et al.* (2013), sostienen que considerando a Marruecos como el principal proveedor de RP (85%) y de acuerdo con la demanda de fertilizantes destinada a la producción de alimentos para la creciente población mundial, las reservas de este mineral pueden estar disponibles entre 300 y 400 años más.

Sin embargo, debe tenerse claro que es muy difícil que el P desaparezca en su totalidad del planeta. El flujo del elemento depende entonces de la habilidad para usar los sitios donde se encuentre (estiércoles, agua y fondo de mar, plantas de agua municipales, minas no exploradas, P fijado en el suelo, etc.), y llevarlo a la raíz de la planta (Melia *et al*., 2017). En este sentido, la estrategia para obtenerlo puede ser el procedimiento que encarezca la adquisición de P en el futuro (Jacobs *et al.,* 2017).

2.4 Situación mundial del mercado de los fertilizantes que contienen P

Según López y Vallejo (2005), la industria de los fertilizantes en su gran mayoría es altamente dependiente del proceso productivo del petróleo y sus derivados (fabricación y fletes). La demanda del mercado también juega un rol importante, es así que en la medida en que aumente la producción agrícola, se incrementa el consumo de fertilizantes y al escasear naturalmente habrá incrementos en los precios. De esta forma, se estima que el consumo mundial de fertilizantes hasta el año 2030 presentará un incremento anual a razón de 1.3%, en tanto que hasta el 2014 se preveía una demanda alrededor del 3% (Konhauser *et al.* 2007). Dadas las anteriores circunstancias, a partir del 2008 la industria mundial ha invertido masivamente para asegurar el abastecimiento de fertilizantes, de allí que en Marruecos, Arabia y China, se preveía incrementar la capacidad de producción de fertilizantes fosfóricos en 7.6 millones de toneladas para el 2017 (Agrocafé, 2014).

Colombia requiere acceder al mercado internacional para satisfacer sus necesidades de fertilizantes simples y materias primas para la producción de abonos complejos. Los países proveedores son más de 30, aunque los que concentran el mayor volumen de intercambio comercial (84% de las importaciones) son la antigua Unión Soviética, Alemania, Estados Unidos y Venezuela. Para el 2007, se registraba de manera alarmante una significativa demanda de fertilizantes en el ámbito internacional y, por consiguiente, un incremento en los precios de los mismos. Las causas de dicho fenómeno se han asociado con el auge en la producción mundial de oleaginosas y cereales para la alimentación y para la generación de alternativas energéticas como los biocombustibles (Suárez, 2008). En el año 2008, la tasa en la utilización de fertilizantes fosfatados registró un alza anual del 3.4%, frente a un incremento histórico del 1.8%. Esto se reflejó en los precios de venta al consumidor; por ejemplo, el DAP (18-46-0) experimentó un aumento del 355% entre enero de 2007 y julio de 2008 (Suárez, 2008).

En el 2013, la demanda mundial de fertilizantes fosfóricos se redujo en un 0.5% y en consecuencia, el volumen de inventarios aumentó significativamente. Una de las causas pudo estar asociada con el debilitamiento de la rupia frente al dólar y el desmonte de subsidios para fertilizantes en la India, país que importa el 33% del volumen comercializado

en el mundo. La situación en mención condujo a muchos fabricantes a reducir la producción en sus plantas durante casi todo el año. Consecuentemente, hubo una reducción en la oferta de estos insumos y esto ocasionó a finales de 2013 una nueva alza en los precios de venta, la cual se estima tiende a mantenerse en los años siguientes (Agrocafé, 2014).

En las últimas décadas, el consumo mundial de fertilizantes viene creciendo significativamente (Alexandratos, 2012). Predicciones, establecen que la tasa de adquisición tiende a incrementarse hasta el año 2050 con el objetivo de suplir la demanda requerida en cultivos de cereales y oleaginosas principalmente (Alexandratos y Bruinsma, 2012); este fenómeno ha dado como resultado que la industria proyecte un sobre abastecimiento de materias primas para satisfacer las potenciales necesidades del mercado (IFA, 2013). Las anteriores circunstancias, sumadas al hecho que algunas de las fuentes minerales que constituyen base fundamental de los fertilizantes comúnmente utilizados están en vía de agotamiento (Rolewicz *et al.,* 2017), vienen generando incertidumbre de tipo técnico y económico transferidas al consumidor a través del precio de venta, tal como se ha registrado en épocas recientes (Cordell *et al*., 2009).

Lo mencionado, pone en riesgo la economía agrícola, particularmente la soberanía de los países que como Colombia, depende de los fertilizantes importados. Por lo anterior, es necesario continuar en la búsqueda de herramientas como las de tipo biológico y biotecnológico que reduzcan la dependencia de los fertilizantes importados a través de un uso racional de los fertilizantes fosforados. Como visión anticipatoria a la problemática citada, en el año 2009, en Colombia se propuso a través del documento CONPES No. 3577 (DNP, 2009), un plan de acción orientado a fomentar los biofertilizantes, a investigar el uso de reservas minerales en la agricultura y a disminuir el uso de fertilizantes importados.

2.5 Requerimientos de P por el cafeto

Los requerimientos de P por el cafeto son diferentes de acuerdo a la etapa de desarrollo en la cual se encuentre. Para la etapa de almácigo o de vivero se ha encontrado respuesta a la aplicación de fertilizantes fosforados (Salazar, 1977), inclusive cuando ya se ha utilizado abono orgánico mezclado en el sustrato. En este caso la recomendación general es aplicar DAP (18-46-0) a razón de 8 g bolsa de 2 kg, esto equivale a aplicar 2 g de P_2O_5 por kg a los dos y cuatro meses de edad después del transplante (Ávila *et al.*, 2007); esta aplicación es genérica y se hace independientemente del tipo de suelo. En el período de levante (desde la siembra en el campo de una planta de almácigo de 6 meses de edad hasta los 18 meses después de sembrada), se recomienda aplicar P sólo cuando el nivel de P por el método Bray II del suelo se encuentra por debajo de 30 mg kg^{-1}.

Para la fase productiva se han efectuado ajustes tendientes a disminuir las cantidades a aplicar dada la poca magnitud de la respuesta al suministro de dicho elemento. Uribe y Mestre (1976) evaluaron dos dosis de P_2O_5 de 120 y 240 kg ha^{-1} $año^{-1}$ y no encontraron respuesta a su aplicación, lo cual sugiere que las dosis requeridas estarían por debajo de 120 kg. Valencia, (1998) recomendaba aplicar alrededor de 80 kg ha^{-1} $año^{-1}$, y más reciente, las cantidades a aplicar estarían alrededor de 60 kg ha^{-1} $año^{-1}$ (Sadeghian y González, 2012). Lo anterior se basa en que en suelos de la zona cafetera cuando el nivel de P-Bray II era inferior a 20 mg kg^{-1}, y no se aplicaba P como fertilizante, se presentaban leves reducciones en el rendimiento del cultivo (Sadeghian, 2003).

Es muy posible continuar con ajustes más refinados, ya que en algunas situaciones no ha habido respuesta a la aplicación, pero en general se requiere aplicar al menos 20 kg de P (P_2O_5) ha^{-1} para restituir la extracción asociada a 400 arrobas de café pergamino seco (5000 kg) producidas por hectárea (Sadeghian *et al.*, 2006). Esto no incluye la demanda del elemento de las hojas, tallos y raíces.

Es claro que aún hay posibilidad para que se hagan algunos ajustes que permitan refinar las recomendaciones de fertilización con P, principalmente de acuerdo con el tipo de suelos para las diferentes fases del cultivo y para brindar opciones a los sistemas de producción orgánica de café que presenten restricción en el uso de fertilizantes de síntesis química

hidrosolubles. Desde el punto de ambiental, resulta imperioso proponer opciones que sumen a las iniciativas de reducción de los gases efecto invernadero generados por las técnicas de fabricación de fertilizantes tradicionales (Gilbert *et al.,* 2014).

2.6 Microorganismos solubilizadores de P

Como se ha mencionado, a pesar que los requerimientos de P en el cultivo del café son relativamente bajos comparados con otros nutrimentos como el nitrógeno y el potasio, es necesario garantizar este elemento en los planes de fertilización, especialmente en las primeras fases de desarrollo del cultivo. Las recomendaciones se basan en cantidades de fertilizante fosfórico soluble independientemente del tipo de suelos o complementadas con fuentes de bajo costo y solubilidad como la RP, cuando sea necesario aplicar P y corregir la acidez. Esto indica que si bien la RP puede constituir fuente de este nutriente, presenta limitaciones de tipo químico dada la reacción alcalina que genera su aplicación o de carácter físico en virtud a su incompatibilidad con otras fuentes fertilizantes de uso común en los planes de abonamiento del café.

Por lo anterior, este tipo de materiales, requieren de un tratamiento previo para ser utilizados como fertilizante. De allí que, a través del uso de microorganismos, se venga investigando en aras de incrementar su eficacia agronómica a bajo costo; dado que su actividad metabólica y de crecimiento genera sustancias que pueden hacer soluble el P contenido en los citados minerales.

La eficacia relativa de los microorganismos solubilizadores de P depende en buena medida de los ácidos que secretan al medio (Bojinova *et al., 2*008; Haq *et al*., 2003). En este sentido, se han evaluado numerosos organismos que asociados a la rizosfera de diversos cultivos exhiben este potencial. Zahir *et al.* (2003) referenciaron que del total de bacterias que pueden ser aisladas del rizoplano de numerosas especies cultivadas, cerca del 25% de ellas tienen alguna capacidad para disolver fosfatos. Sobre el tema, en cultivos de palma de aceite en Colombia, Acevedo *et al.* (2014) destacan dos géneros de hongos

(*Aspergillus* y *Penicillium*) y a la bacteria *Klebsiella neumoniae* por su efectividad para disolver fosfatos de Ca.

Del mismo modo, hongos del género *Aspergillus* spp. han logrado disolver hasta el 98% del P presente en rocas de muy bajo potencial de solubilización provenientes de minas en África, Jordania, Israel, Marruecos e India (Reddy *et al.,* 2002). Por ejemplo, Xiao *et al.* (2008) reconocen a los hongos *Penicillium expansum* y *Mucor ramossimus*, y a la levadura *Candida krisii* por su habilidad en disolver RP de origen Chino.

Zayed y Abdel-Motaal (2005) corroboraron que el uso de RP en asocio con los hongos *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*, induce a la solubilización del P presente en el mineral, obteniendo incrementos significativos de fósforo aprovechable. Caballero *et al.* (2007) registraron, bajo condiciones de laboratorio, eficiencias en la solubilización de roca fosfórica por parte de la enterobacteria *Burkholderia cepacia* obtenida de plantaciones de algodón en los departamentos de Cesar y Meta en Colombia.

Vera *et al*. (2002) aislaron algunos organismos de la rizosfera de la planta de arazá (*Eugenia* spp.) cultivado en los Llanos Orientales de Colombia y constataron que *Aspergillus aculeatus*, además de tres cepas de *Trichoderma* spp., solubilizaron eficientemente fosfato de calcio.

Con relación a otros materiales que contienen P, Vera *et al.* (2002) destacan a *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces* sp, *Gongronella butlieri* y *Fusarium redondels* por su habilidad como solubilizadores de otro mineral diferente como fosfatos de Fe. Del mismo modo, Oliveira *et al*. (2014) evaluaron más de 57 cepas de HSP obtenidas de plantaciones de eucalipto y su efectividad para solubilizar P desde materiales tales como fosfatos de Fe, fosfatos de Al, fosfatos de Ca y RP de dos procedencias. Encontraron que el principal mecanismo de solubilización era la secreción de ácidos orgánicos (AO) y que la cantidad y el tipo de AO secretados dependía de la fuente mineral en la que el HSP crecía.

Hongos del género *Trichoderma*, han sido reportados por su capacidad de solubilizar fosfatos de calcio en función de su actividad ácida y de generar fitasas y fosfatasas ácidas, condición que los postula como agentes solubilizadores de P orgánico (Zhao and Zhang, 2015).

Finalmente, con relación a la solubilización de P por bacterias, *Pseudomonas fluorescens*, aislada de la rizosfera de soya y arveja, mejoró la disponibilidad de P y, por consiguiente, favoreció el crecimiento de raíces de trigo e indujo a la generación de nuevos brotes (Katiyar y Goel, 2003). En Maíz hubo incrementos en diversas variables asociadas con su crecimiento y desarrollo, luego de ser inoculado con diferentes grupos funcionales solubilizadores de P. Los géneros empleados fueron *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*; todos ellos aislados de compost elaborado a partir de estiércol, paja de arroz, hojas de la planta *Gliricidia* sp. y lombricompuesto (Hameeda *et al.,* 2008). Estrada *et al*. (2017), reconocen al género *Bacillus* por su capacidad para estabilizar (producir C lábil) el compost hecho de residuos de caña de azúcar y en la contribución para disolver RP adicionada al sustrato. Esto indica que inocular este tipo de materiales orgánicos con *Bacillus sp*. (cepa BACBR01), puede conducir a acelerar el proceso de compostaje dada la alta multiplicación del género y la subsiguiente generación de P aprovechable por las palantas en virtud a la capacidad que exhibe el organisos para disolver P. El fenómeno descrito puede explicarse en parte a que el citado organismo tiene la capacidad de producir ácido láctico resultado de la fermentación de la glucosa en condiciones de baja presión de oxígeno, fenómeno que estaría generando bajo nivel de pH. Bajo estas condiciones, se estría limitando la abundancia relativa de otros organismos que participan en el proceso de compostaje y explicarían la disolución de fosfatos de Ca en la RP.
Específicamente en café la literatura respecto al tema es escasa, se cuenta con algunas experiencias llevadas a cabo en laboratorio por González y Escudero (2015) quienes registran numerosas cepas de hongos, habitantes naturales de ecosistemas cafetreros, con capacidad para disolver RP en condiciones de laboratorio. Madhaiyan *et al.* (2004). aislaron de la rizosfera de plantaciones de café en la India *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bacteria reconocida por su actividad nitrogenasa, la cual exhibió solubilización de algunas formas de fósforo, especialmente fosfato de Zinc.

Basados en las anteriores consideraciones, el empleo de organismos asociados a la raíz del cafeto puede contribuir a mejorar la disponibilidad de P en suelos con alto potencial de fijación. Lo anterior cobra importancia en caso tal de que, por alguna circunstancia, se deba hacer uso de fuentes de baja solubilidad como las RPs.

2.6.1 Hongos micorrizico- arbusculares (HMA) en la eficiencia en el crecimiento de las plantas

Los HMA son reconocidos por establecer dos modalidades de asociación: De tipo endomicorrítico, cuyas hifas forman una red interna que penetra las células de la corteza radical y generan arbúsculos en el córtex (Habte, 2000), o de tipo ectomicorrítico en donde las raíces de las plantas hospedantes aparecen cubiertas por un grueso manto de hifas (Mehgel y Kirkbi, 2000). En general, se estima que más del 90% de las especies vegetales (excepto la remolacha y plantas de la familia Brassicacea) logran establecer cualquiera de los tipos de asociaciones descritas, sin que esto signifique que los HMA presenten un mecanismo de reconocimiento por algún grupo taxonómico en particular (Osorio, 2015).

Araujo *et al*. (2018) reportan 16 especies pertenecientes a 6 géneros de HMA, estableciendo simbiosis con plantas de acacia y eucalipto. En maíz, se encontró un alto nivel de colonización por 20 especies de HMA distribuidos en 6 géneros, los cuales en conjunto, se asociaron con el crecimiento y la concentración de P foliar en la planta (Novais *et al*. 2014).

Los últimos autores citados, explican que, aunque el 92% de los HMA obtenidos contribuyeron a la absorción de P por la planta, existe otro porcentaje que contribuye con el incremento de las variables fisológicas del crecimiento. Esto indica que una combinación de inóculos provee mecanismos benéficos diversos al cultivo, circuntancia que puede asociarse a la morfología de sus hifas y a la localización del crecimiento de estas en su hospedero. Familias taxonómicas Glomeraceae y Acaulosporaceae presentan una alta capacidad infectiva en virtud a que la morfología “delicada” de sus hifas permiten un “ordenado crecimiento” y por ende rápida colonización de las raíces, pero baja capacidad de exploración del suelo, aspectos que las postula como protectoras de patógenos. En contraste, las Gigasporaceae tienden a generar hifas “robustas”, densamente agregadas, con la particularidad de colonizar su hopedero lentamente y a la vez explorar a través de la extensión de sus hifas, mayor cantidad de suelo formando una extensa red micelial, resultado de esto, es su potencial para la nutrición.

En cuanto a la localización de las hifas de los HMA en las raíces de su hospedero, se ha establecido que la mayoría de la biomasa de las Gigasporaceae se hallan por fuera de la raíz de las plantas, en tanto que, para las Glomeraceas, estas estructuras se encuentran dentro de la raíz de su hospedero. Las de pertencecientes a la familia Acaulosporaceae pueden ser un tercer grupo, dado que producen muy poca cantidad de hifas dentro y fuera de la raíz (Maherali y Klironomos, 2007).

Lo anteriormente discutido, puede servir como criterio inicial de selección de HMA tanto para propósitos experimentales como para recomendaciones a escala general.

Específicamente hablando de la fisología d los HMA, es bien sabido que su ingresoa a las raíces de su hospedante se da vía apresorio y su crecimiento y formación se da en respuesta a las señales emitidas por parte de la planta hospedante, entre ellas producción de flavonoiodes y estrilogactonas (Siddiqui y Husen, 2017) derivados de la ruta de los caroteniodes (Sanders and Croll, 2010), ácido abscisico (Chiou *et al.,* 2011) y activación de diversos genes, entre ellos los factores *Myc* (Horn *et al.,* 2017; López *et al*., 2014). Los hongos liberan Mycofatores que inducen en la planta a la expresión del gen *ENOD11*. Como resultado, las plantas preparan sus células previamente para que el hongo ingrese a través de ellas. Las estructuras resultantes se denominan túneles o apartatos de ingreso del hongo (Sanders and Croll, 2010).

Resultado de lo anterior, las raíces captan con mayor eficiencia los nutrientes más allá de la superficie de contacto de la raíz con el suelo circundante (Lebrón *et al.,* 2012), y luego los conduce a través de sus hifas hasta las células corticales donde los libera (Osorio, 2014). Esto se traduce en el favorecimiento en la viabilidad de las semillas, mayor crecimiento vegetativo, y por ende, aumentos significativos en los niveles de ciertos nutrientes esenciales en el tejido foliar (Ortas *et al.,* 2016; Ortas y Ustuner, 2014); así como tolerancia de a condiciones de estrés hídrico (Gong *et al*., 2013; Zhu *et al.,* 2018).

Específicamente para el caso del P, Osorio (2015) sostiene que las HMA presentan mayor afinidad que las raíces para captar el P aún en condiciones de muy bajo nivel del elemento. Esta eficiencia puede darse por que el radio de las hifas de HMA (1-3 mm) descarta la posibilidad de que se presente una zona de agotamiento para el P a su alrededor, contrario

a lo que se evidencia aún con raíces finas. Hammond y White (2008), en su revisión acerca del comportamiento radical de las plantas en ambientes con carencia de este elemento, sostienen que la asociación micorrizal puede hacer disponible el P del suelo a partir de la secreción de fosfatasas ácidas.

A pesar de los beneficios descritos anteriormente, es preciso recalcar que el uso de este tipo de insumos biológicos (biotecnologías) presenta sus limitaciones, lo cual en muchos casos ha derivado en resultados poco satisfactorios. El fenómeno descrito, en parte se debe al funcionamiento del hongo donde se compromete un alto costo metabólico, representado entre un 20 y 30% del Carbono fijado en la fotosíntesis (López *et al*., 2014).

Roth y Paszkowski (2017) explican que una vez los HMA colonizan las raíces, ocurre en esta estructura vegetal un flujo de diferentes tipos de carbohidratos, entre los cuales se encuentran las hexosas (Sanders y Croll, 2010) proveniente de las hojas. Esto indica que dicha asociación es sensible a la concentración de P soluble en el suelo (Osorio y Habte; 2015 Sewnet and Tuju, 2013), dado que un nivel muy alto o insuficiente del nutriente, desencadenaría efectos negativos en las plantas, generando un “efecto parasítico” (Nogueira, 2017; Rai *et al.* 2013) dado que el hongo continuaría demandando sustancias carbonáceas (Wang *et al*., 2017) sin que dicho efecto se vea reflejado en la adquisición de P y de otros recursos necesarios para el metabolismo de su hospedante (Lebrón *et al*., 2012; López *et al*., 2014). Esta circunstancia puede ser inducida por variaciones en el pH del suelo (Lindsay, 2001) en donde sus efectos pueden entre otros, generar desbalances de otros nutrientes como el Zn (Ozdemir *et al.,* 2010; Bhattacharya y Bagyaraj, 2002) y nitrógeno (De Beenhouwer *et al*., 2015; Paszkowski y Gutjahr, 2013); los cuales constituyen elementos esenciales para la formación, el funcionamiento y la multiplicación de HMA (Dutt *et al.,* 2013).

2.6.2 HMA en la absorción de P y el crecimiento del café

Existen muchos registros del efecto benéfico de los HMA sobre el crecimiento, desarrollo y absorción de nutrientes en plantas de café (*Coffea* spp.), tanto en sus estados iniciales de desarrollo y como en su fase reproductiva. Las respuestas registradas dependen

principalmente de la especie y variedad del café, del tipo de HMA y del nivel de P en el suelo, entre otros factores.

Por ejemplo, al inocular plántulas de la especie *C. arabica* con los hongos *Gigaspora margarita, Acaulospora laevis* y *Glomus caledonicum* se encontró una alta colonización micorrizal que fluctuó entre 72 y 83% (Bhattacharya y Bagyaraj, 2002). Dentro de esta misma especie de café y en condiciones naturales de campo (sin aplicación de HMA), las variedades Caturra y Borbón han evidenciado colonización por *Glomus* sp. en ecosistemas cafeteros de Puerto Rico (Lebrón *et al.,* 2012) y diferentes cultivares de *C. arabica* establecidos en Etiopía (De Beenhouwer *et al.,* 2015; Chanie y Assefa, 2013). En la zona cafetera Colombiana Bolaños *et al.* (2000) registran para cafetales establoecidos, porcentajes de colonización alrededor del 20% hasta 70%, siendo las especies *Acaulospora mellea* y *Glomus occultum* las de mayor frecuencia de aparición, hallando asociación entre la variable objeto de estudio y el nivel de P extraído por Bray II. Villarreal (1997), reporta aislamientos de *Glomus etunicatum* a partir de café variedad caturra; en tanto que Angarita (2000), registró los géneros *Sclerocytis, Acaulospora* y *Glomus*, como habitantes naturales de los sustratos orgánicos recomendados para almácigos de café.

Lo presentado anteriormente, revela cómo los cultivares de *C. arabica* presentan afinidad para ser colonizados por diferentes géneros de HMA. Situación que ha conducido al desarrollo de experimentos para evaluar la respuesta del café a su aplicación (Orozco, 1988; Rivillas y Dodd, 1996) con miras a la optimización en el uso de nutrimentos y la reducción de costos ambientales y de producción. En vista de que no en todos los casos la respuesta ha sido satisfactoria, se hace necesario sumar al conocimiento de la abundancia y efectividad de los HMA, el entendimiento de las variables o atributos del suelo que conducen a que la simbiosis sea efectiva. Bajo este esquema, a través de la dependencia micorrizal (DM), se ha hecho posible predecir la respuesta al suministro de HMA, en condiciones específicas de fertilidad del suelo, particularmente en lo que respecta al contenido de P en solución. Es una variable que se expresa como el porcentaje de la diferencia entre la masa seca de las plantas inoculadas y no inoculadas sobre la masa seca de plantas inoculadas y da razón en diferentes categorías, de cuán exitosa es la inoculación.

En estos términos, Habte y Biitenbender (1999) encontraron que la DM en variedad Typica está entre el 50 y 70%. Similares resultados se presentaron a partir de las investigaciones de Jaramillo y Osorio (2009) en materiales de Caturra y var. Colombia. Recientemente Cuervo (2017), establece para líneas y variedades regionales de importancia en la caficultura de Colombia, que a pesar de que las variedades Castillo Naranjal, Castillo Tambo, y Tabi presentan porcentajes de colonización relativamente bajos (≤30.5%) por el inóculo suministrado, se destaca que dichos materiales presentan un valor de dependencia micorrizal entre el 89 y 93% por *Rhizoglomus fasciculatum*.

En vista de que la DM se encuentra estrechamente relacionada con el nivel de P soluble en el suelo, en condición de carencia o exceso del elemento, los efectos pueden ser incluso negativos de acuerdo con lo reportado por Cuervo (2017) y Jaramillo y Osorio (2009), por los fenómenos que se han venido discutiendo. En general, los autores destacados establecen para las variedades citadas, un nivel de P 0.2 mg L^{-1} en la solución del suelo es el adecuado para alcanzar los mejores resultados en lo que respecta al crecimiento y absorción de P en estado de almácigo.

2.6.3 Rhizoglomus fasciculatum

Desde el punto de vista de su taxonomía, pertenece al Phylum: Glomeromycota (Redecker *et al*., 2000), Clase: Glomeromycetes y Orden: glomerales (Hibbett *et al*., 2007).

Hasta 2010, fue considerado como Glomus (Tulasne y Tulasne, 1845) y *Rhizophagus* (Schüßler and Walker, 2010); recientemente se reporta con el género *Rhizoglomus* (Sieverding et al., 2015). Especie: *fasciculatum.*

El descrito HMA, viene siendo utilizado con éxito en diferentes cultivos dado su reconocido papel en la promoción del crecimiento de las plantas y abosorción de P. La tabla 2-2, resume algunas experiencias de investigación que demuestran la bondad de diferentes HMA y en especial del uso de R. fasciculatum en cultivos de interés comercial.

La tabla 2-2 presenta un resumen de las experiencias experimentales con HMA en diferentes suelos y cultivos.

Tabla 2-2. Experiencias de investigación con HMA en diversas áreas y cultivos de interés comercial.

HMA	Cultivo	Resultado	Referencia
Rhizoglomus fasciculatum	*Leucaena leucocephala*	Crecimiento y aborción P	Osorio y Habte (2015)
	Persea amaericana Var Hass	Crecimiento y aborción P	Serna (2013)
	Vigna sp.	Crecimiento y aborción P	Ramírez *et al*. (2013)
	Passiflora purple	Germinación semillas, crecimiento y absorción P	Ramírez *et al*. (2015)
	Nageia rospigliosi	Crecimiento y aborción P	Diez *et al.* (2008)
	Solanum quitoense -Rubus glaucus	Crecimiento y aborción P	González y Osorio (2008)
Seis (6) géneros	*Acacia* sp. *Eucaliptus* sp.	Crecimiento y aborción P	Araujo *et al*. (2018)
Ocho (8) géneros	*Zea maiz*	Caracterización	Novais *et al.* (2014)
Glomus mosseae	*Vitis sp.*	Crecimiento y aborción nutrientes	Ozdemir *et al*. (2010)
Glomus etunicatum	*Citrus* sp.	Reducción materia seca por alto P	Nogueira (2017), Atunes y Cardoso (1991)
Once (11) especies	*Araucaria angustifolia*	Dosis P determinan prevalencia HMA	Moreira *et al*. (2012)
Glomus sp.	*Glycine max*	Incremento biomasa total	Nogueira (2017)
Glomus sp.	*Coffea arabica*	Colonización	Beebhouwer *et al.* (2015), Chanie y Assefa (2013)
Acaulospora sp, Glomus occultum, Glomus etunicatum		Colonización	Bolaños *et al.* (2000); Villerreal (1997)
Sclerocytis, Acaulospora y *Glomus*		Colonización diferentes sustratos para almácigos	Angarita (2000)
Acaulospora tuberculata, Glomus spp., Scutellospora heterogama		Crecimiento de plantas jóvenes (almácigos)	Rivillas y Dodd (1996)
Diferentes géneros		Control patógenos	Gaitán *et al*. (2011)
Glomus clarum Gigaspora margarita		No claro efecto en crecimiento	Franca *et al.* (2014)
Rhizoglomus fasciculatum		Crecimiento y aborción P	Jaramillo y Osorio (2009), Cuervo (2017)
Gigaspora margarita		Crecimiento y absorción nutrientes negativo con alto P	Colozzi y Siqueira (1986)

2.7 Bibliografia

Acevedo, E., Galindo-Castaneda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in Colombia. Applied Soil Ecology, 80, 26-33.

Agroinsumos del café S.A. - Agrocafé. (2014). Informe de gestión 2014. Informe de junta directiva. Bogotá (Colombia). 39p.

Al-Thyabat, S., & Zhang, P. (2015). In-line extraction of REE from Dihydrate (DH) and HemiDihydrate (HDH) wet processes. Hydrometallurgy, 153, 30-37.

Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision (12-03, p. 4). Rome, FAO: ESA Working paper.

Angarita D.; M. del P. (2000). Aislamiento, identificación y evaluación de endomicorrizas nativas y otros microorganismos en diferentes sustratos para almácigos de café. Bogotá (Colombia), Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. 209 p.

Antunes, P. M., Schneider, K., Hillis, D., & Klironomos, J. N. (2007). Can the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices actively mobilize P from rock phosphates?. Pedobiologia, 51 (4), 281-286.

Araujo P., A.P., Santana M.C., Bonfim, J.A., Mescolotty, D., Nogueira C. E.J. Digging deeper to study the distribution of mycorrhizal arbuscular fungi along the soil profile in pure

and mixed *Eucalyptus grandis* and Acacia. Applied Soil Ecology. DOI: 10.1016/j.apsoil.2018.03.015. In press.

Avila, W., Sadeghian, S., Sanchez, P., & Castro, H. (2013). Producción de almácigos de café en el departamento de Santander con diferentes fuentes de materia orgánica y de fósforo. Avances Tecnicos Cenicafé, No. 356, 1-12.

Belboom, S., Szöcs, C., & Léonard, A. (2015). Environmental impacts of phosphoric acid production using di-hemihydrate process: a Belgian case study. Journal of Cleaner Production, 108, 978-986.

Bhattacharya, S., & Bagyaraj, D. J. (2002). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal isolates on arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Biological agriculture & horticulture, 20 (2), 125-131.

Bojinova, D., Velkova, R., & Ivanova, R. (2008). Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger.* Bioresource technology, 99 (15), 7348-7353.

Bolaños, M., Rivillas, C., & Suárez, S. (2000). Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera Colombiana. Cenicafé, 51 (4), 245-262.

Bravo, G., & Gómez, A. (1974). Capacidad de fijación de fósforo en seis unidades de suelo de la zona Cafetera Colombiana. Cenicafe, 25 (1), 19-29.

Bünemann, E. K. (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus–A review. Soil Biology and Biochemistry, 89, 82-98.

Caballero, T., Camelo, M., Martinez, M. (2007). Determinación de actividad fosfato solubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algodoneros en los departamentos de Cesar y Meta. Suelos Ecuatoriales 37 (1): 94-100

Camacho, G., J.A. (2002). Mapa de recursos minerales de Colombia “Minerales Industriales”. Exploración y evaluación de Recursos naturales. Memoria Explicativa. Bogotá (Colombia) Ministerio de Minas y energía. INGEOMINAS. 55p.

Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. Agriculture, ecosystems & environment, 116 (1), 72-84.

Chiou, T. J., & Lin, S. I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. Annual review of plant biology, 62, 185-206.

Chanie S., T., Assefa T, S. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with shade trees and Coffea arabica L. in a coffee-based agroforestry system in Bonga, Southwestern Ethiopia. Afrika focus — Volume 26, Nr. 2— pp. 111-131

Chrysargyris, A., Panayiotou, C., & Tzortzakis, N. (2016). Nitrogen and phosphorus levels affected plant growth, essential oil composition and antioxidant status of lavender plant (*Lavandula angustifolia* Mill.). Industrial Crops and Products, 83, 577-586.

Chiputwa, B., Spielman, D. J., & Qaim, M. (2015). Food standards, certification, and poverty among coffee farmers in Uganda. World Development, 66, 400-412.

Colozzi F., A., Siqueira, J.O. (1986). Micorrizas vesiculo-arbusculares em mudas de cafeeiro. 1. Efeitos de /Gigaspora margarita/ de adubacao fosfatada no crescimento e nutricao. Revista Brasileira de Ciencia do Solo (Brasil) 10(3):199-205

Condron, L. M., Turner, B. L., & Cade-Menun, B. J. (2005). Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. Phosphorus: agriculture and the environment, (phosphorusagric), 87-121.

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. Global environmental change, 19 (2), 292-305.

Cuervo C. J. (2017). Dependencia micorrizal de variedades de café bajo diferentes concentraciones de fosfato soluble en el suelo. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Maestría en Geomorfología y Suelos. (Tesis de M.Sc). Medellín (Colombia). 92p.

De Araujo P., A.P., Santana, M.C., Bonfinm, J.A., Mescolotti, D. de L., Nogueira, C. E.J.B. Digging deeper to study the distribution of mycorrhizal arbuscular fungi along the soil profile in pure and mixed Eucaliptus grandis and Acacia magnium plantations Digging. (2018). Applied Soil Ecology xxx (xxxx) xxx–xxx.

De Beenhouwer, M., Van Geel, M., Ceulemans, T., Muleta, D., Lievens, B., & Honnay, O. (2015). Changing soil characteristics alter the arbuscular mycorrhizal fungi communities of Arabica coffee (*Coffea arabica*) in Ethiopia across a management intensity gradient. Soil Biology and Biochemistry, 91, 133-139.

Diez G., M.C., Osorio V., N.W., Moreno H., F.H. Evaluación de la dependencia micorrizal del pino romerón (Nageia rospigliosii P.) bajo condiciones lumínicas contrastantes. (2008). Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín, Volumen 61, Número 2, p. 4554-4563.

Departamento Nacional de Planeación de Colombia (DNP) (2009) Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario. Documento CONPES 3577. Consejo Nacional de Política Económica y Social, República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación. Bogotá, D.C. 18 de Marzo de 2009. 34p.

Dutt, S., Sharma, S. D., & Kumar, P. (2013). Arbuscular mycorrhizas and Zn fertilization modify growth and physiological behavior of apricot (Prunus armeniaca L.). Scientia horticulturae, 155, 97-104.

Estrada B., G.A.; Lopes, C.M.; Durrer, A.; Alves, P. RL.; Passaglia, N. & Cardoso E., J.B.N. (2017). Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamicsand the bacterial community during composting of sugarcaneindustry waste. Systematic and Applied Microbiology 40 (2017) 308–313

Federacion Nacional de Cafeteros de Colombia - FNC. (1992). Informe de la comisión de técnicos a los departamentos de Caquetá, Casanare y Meta. Estudio Técnico-Económico-Agrológico. Bogotá (Colombia), FNC. 55p. (Mecanografiado).

Fink, J. R., Inda, A. V., Bavaresco, J., Barrón, V., Torrent, J., & Bayer, C. (2016). Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. Soil and Tillage Research, 155, 62-68.

Fox, R. L. (1974). Examples of anion and cation adsorption by soils of tropical America. Ejemplos de adsorción de aniones y cationes por los suelos de América tropical. Tropical Agriculture, 51 (2), 200-210.

Fox, R. L., & Kamprath, E. J. (1970). Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. Soil Science Society of America Journal, 34 (6), 902-907.

Gaitán B., A.L., Villegas G., C, Rivillas O. C.A., Hincapié G., E., Arcila P., J. Almácigos de café: Calidad fitosanitaria manejo y siembra en el campo. 2011. Chinchiná: CENICAFE. 8 p. (Avances Técnicos No. 404).

Gilbert, P., Alexander, S., Thornley, P., & Brammer, J. (2014). Assessing economically viable carbon reductions for the production of ammonia from biomass gasification. Journal of cleaner production, 64, 581-589.

Gong, M., Tang, M., Chen, H., Zhang, Q., & Feng, X. (2013). Effects of two Glomus species on the growth and physiological performance of Sophora davidii seedlings under water stress. New Forests, 44 (3), 399-408.

Gonzalez O., H. (2013) Identificación de las principales unidades de suelos de la zona cafetera. p 269-283. En: Cenicafe. Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Chinchiná: FNC: CENICAFE, 3 vols.

González, O. H., & Escudero, J. Phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from Colombian Coffee Zone soils. In: 25th International conference on coffee science. Armenia: ASIC, 2015. 4p.

González, O., & Osorio V., N.W. Determinación de la dependencia micorrizal del lulo. (2008). Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 2, 163 - 174

Guerrero Riascos, R. (1983). Los fertilizantes químicos, propiedades y comportamiento agronómico (No. DC-0033). Monómeros Colombo Venezolanos.

Paszkowski, U., & Gutjahr, C. (2013). Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Frontiers in plant science, 4, 204.

Habte, M. (2000). Mycorrhizal fungi and plant nutrition. Plant nutrient management in Hawaii's soils, approaches for tropical and subtropical agriculture. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Manoa, Hawaii, 127-131.

Habte, M., & Bittenbender, H. C. (1999). Reactions of coffee to soil solution P concentration and arbuscular mycorrhizal colonization. Journal of South Pacific Agriculture, 6, 29-34.

Hall, J. K., & Baker, D. E. (1971). Phosphorus fixation by montmorillonite and vermiculite clays as influenced by pH and soluble aluminum. Soil Science Society of America Journal, 35 (6), 876-881.

Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., & Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological research, 163 (2), 234-242.

Haq, I. U., Ali, S., & Iqbal, J. (2003). Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, 38 (6), 921-924.

Hinsinger, P., & Gilkes, R. J. (1997). Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in an acid, P-fixing mineral substrate. Geoderma, 75 (3-4), 231-249.

Horn, P., Schlichting, A., Baum, C., Hammesfahr, U., Thiele-Bruhn, S., Leinweber, P., & Broer, I. (2017). Reprint of "Fast and sensitive *in vivo* studies under controlled environmental conditions to substitute long-term field trials with genetically modified plants". Journal of biotechnology, 257, 22-34.

Huang, Y. T., Lowe, D. J., Churchman, G. J., Schipper, L. A., Cursons, R., Zhang, H., & Cooper, A. (2016). DNA adsorption by nanocrystalline allophane spherules and nanoaggregates, and implications for carbon sequestration in Andisols. Applied Clay Science, 120, 40-50.

International Fertilizer Indutry Association (IFA). (2013). Fertilizer outlook 2013-2017. 81° IFA annual conference. Chicago (USA), 20-22 may.

Ige, D. V., Akinremi, O. O., & Flaten, D. N. (2007). Direct and indirect effects of soil properties on phosphorus retention capacity. Soil Science Society of America Journal,71 (1), 95.

Jacobs, B., Cordell, D., Chin, J., & Rowe, H. (2017). Towards phosphorus sustainability in North America: A model for transformational change. Environmental Science & Policy, 77, 151-159.

Jalali, M., & Jalali, M. (2016). Relation between various soil phosphorus extraction methods and sorption parameters in calcareous soils with different texture. Science of the Total Environment, 566, 1080-1093.

Jaramillo S. P.; Osorio N. W. (2009). Factores que determinan la dependencia micorrizal de las plantas. Suelos Ecuatoriales, 35 (2), 34-40.

Juo, A. S. R., & Fox, R. L. (1977). Phosphate sorption characteristics of some bench-mark soils of west Africa. Soil Science, 124(6), 370-376.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. Archives of Agronomy and Soil Science, 56 (1), 73-98.

Katiyar, V., & Goel, R. (2003). Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of Pseudomonas fluorescens. Microbiological research, 158 (2), 163-168.

Konhauser, K. O., Lalonde, S. V., Amskold, L., & Holland, H. D. (2007). Was there really an Archean phosphate crisis?. Science, 315 (5816), 1234-1234.

Lebrón, L., Lodge, D. J., & Bayman, P. (2012). Differences in arbuscular mycorrhizal fungi among three coffee cultivars in Puerto Rico. ISRN Agronomy. 1-7.

Li, J., Xu, R., Tiwari, D., & Ji, G. (2006). Effect of low-molecular-weight organic acids on the distribution of mobilized Al between soil solution and solid phase. Applied Geochemistry, 21(10), 1750-1759.

Lin, B., Hua, M., Zhang, Y., Zhang, W., Lv, L., & Pan, B. (2017). Effects of organic acids of different molecular size on phosphate removal by HZO-201 nanocomposite. Chemosphere, 166, 422-430.

López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. Annual review of plant biology, 65, 95-123.

López, P, M. R.; & Vallejo, R., M. C. (2005). Administración del capital de trabajo en el sector de fertilizantes y acondicionadoresde suelos en Colombia. EDITADO EN: Bogotá (Colombia). Universidad de los Andes. (Tesis M. Sc. En administración). 131p.

López A., M. (1960). Valoración de las formas de fósforo, orgánica e inorgánica, de un suelo de la zona cafetera de Colombia. Cenicafé 11 (7),189-204.

Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Jovi, D. B. S. S., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K., & Sa, T. (2004). Occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. Microbiological Research,159 (3), 233-243.

Maherali, H., & Klironomos, J.N. (2007). Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. SCIENCE 22, JUNE. VOL 316.

McLean, E. O., & Logan, T. J. (1970). Sources of phosphorus for plants grown in soils with differing phosphorus fixation tendencies.Soil Science Society of America Journal, 34 (6), 907-911.

Matta, S., Stephan, K., Stephan, J., Lteif, R., Goutaudier, C., & Saab, J. (2017). Phosphoric acid production by attacking phosphate rock with recycled hexafluosilicic acid. International Journal of Mineral Processing, 161, 21-27.

Melia, P. M., Cundy, A. B., Sohi, S. P., Hooda, P. S., & Busquets, R. (2017). Trends in the recovery of phosphorus in bioavailable forms from wastewater.Chemosphere, 186, 381-395.

Mengel, K., & Kirkby, E. A. (2000). Principles of plant nutrition. 4. ed. editado en: Berna (Suiza), International Potash Institute, 692p.

Moreira, M., Baretta, D., Nogueira C., E.J. (2012) Phosporus doses determine the prevalence of native arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia.* Ciência Florestal, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 813-820, out.-dez.

Nogueira C., E.J.B. (2017). Importance of Mycorrhizae in Tropical Soils. *In*: J.L. de Azevedo, M.C. Quecine (eds). Diversity and Benefits of Microorganisms fron the tropics. P 245-267. © Springer International Publishing AG.

Novais, C.B., Borges, W.L, Conceicao J., E., Saggin Jr., O.J. & Siqueira, J.O. (2014). Inter- and intraspecific functional variability of tropical arbuscular mycorrhizal fungi isolates colonizing corn plants. Applied Soil Ecology 76 (2014) 78– 86.

Oliveira Mendes, G., de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., & Costa, M. D. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Annals of microbiology,64 (1), 239-249.

Ortas, İ., Akpinar, C., & Demirbas, A. (2016). Sour Orange (Citrus aurantium L.) Growth is Strongly Mycorrhizal Dependent in Terms of Phosphorus (P) Nutrition Rather than Zinc (Zn).Communications in Soil Science and Plant Analysis, 47 (22), 2514-2527.

Ortas, I., & Ustuner, O. (2014). The effects of single species, dual species and indigenous mycorrhiza inoculation on citrus growth and nutrient uptake. European journal of soil biology, 63, 64-69.

Orozco, P. (1988). FH Efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas vesicular arbuscular en plántulas de café Coffea arabica. Var. Colombia. Suelos Ecuatoriales, 18 (2), 213-219.

Osorio V., N. W. (2011) Effectiveness of Phosphate Solubilizing Microorganism in Increasing Plant Phosphate Uptake and Growth in Tropical Soils. In: Dinesh, M. (ED). Bacteria in Agrobiology: Plant nutrient management. Springer NY (USA). P 65-80.

Osorio, N. W. (2005). Función de las enmiendas orgánicas en el manejo de la fertilidad del suelo. Suelos Ecuatoriales 35 (1), 52-58.

Osorio, N.W. (2015). Manejo de nutrientes en suelos del trópico. Colombia 2015. 1 ed: ISBN:978-958-44-97-468.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2015). Effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in tropical soils with contrasting phosphate sorption capacity. Plant and Soil, 389 (1-2), 375-385.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2014). Soil phosphate desorption induced by a phosphate-solubilizing fungus. Communications in soil science and plant analysis, 45 (4), 451-460.

Osorio, N. W., Osorno, L., Leon, J. D., & Álvarez, C. (2017). Plant-Microbe Interactions for Phosphate Management in Tropical Soils. In: Essential Plant Nutrients (pp. 491-512). Springer, Cham.

Ozdemir, G., Akpinar, C., Sabir, A., Bilir, H., Tangolar, S., & Ortas, I. (2010). Effect of inoculation with mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of grapevine genotypes (Vitis spp.). European Journal of Horticultural Science, 75 (3), 103-110.

Rai, A., Rai, S., & Rakshit, A. (2013). Mycorrhiza-mediated phosphorus use efficiency in plants. Environ Exp Biol,11, 107-117.

Ramírez G., J.G., Osorno B., L., Osorio V., N.W., & Morales O., J.G., (2013). Alternativas Microbiológicas para Mejorar el Crecimiento del Caupí. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín, Volumen 66, Número 2, p. 7035-7044.

Ramírez G., J.G., Osorno B., L., Osorio V., N.W., & Morales O., J.G., (2015).Germination and growth of purple passion fruit seedlings under pre-germination treatments and mycorrhizal inoculation. Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, v. 45, n. 3, p. 257-265, Jul./Sep.

Ramírez, F., & Osorio, W. (2005). Efecto de ácidos orgánicos de bajo peso molecular sobre la fijación de fósforo en andisoles. Suelos ecuatoriales (Colombia).35 (2), 71-79.

Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K., & Reddy, M. S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by Aspergillus tubingensis and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 84 (2), 187-189

Rivillas, C., & Dodd, J. C. (1996). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on two different coffee varieties from Colombia and their biochemical detection in roots. Kent, University of Kent. Research School of Biosciences,88p.

Rolewicz, M., Rusek, P., & Borowik, K. (2017). Obtaining of granular fertilizers based on ashes from combustion of waste residues and ground bones using phosphorous solubilization by bacteria Bacillus megaterium. Journal of Environmental Management. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.004, in press.

Romanyà, J., Blanco-Moreno, J. M., & Sans, F. X. (2017). Phosphorus mobilization in low-P arable soils may involve soil organic C depletion. Soil Biology and Biochemistry, 113, 250-259.

Roth, R., & Paszkowski, U. (2017). Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. Current Opinion in Plant Biology, 39, 50-56.

Roy, E. D., Willig, E., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Vazquez, F. F., Pegorini, L., & Porder, S. (2017). Soil phosphorus sorption capacity after three decades of intensive fertilization in Mato Grosso, Brazil. Agriculture, Ecosystems & Environment, 249, 206-214.

Sadeghian, S. (2008). Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia: Guía Práctica. Boletín Técnico N°32. Chinchiná (Colombia), Cenicafé. 43p

Sadeghian, K. S., & González, H. (2012). Alternativas generales de fertilización para cafetales en la etapa de producción. Avances Técnicos Cenicafé,424, 1-8.

Sadeghian, K., S. (2003) Determinación de los niveles críticos para el cultivo del café en suelos de la zona cafetera In: Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Chinchiná Colombia. Informe anual de actividades. Disciplina Suelos. Experimento SUE 0318.Octubre Chinchiná, Cenicafé. 30p.

Sadeghian K., S.; Mejia M., B.; Arcila P., J. (2006) Composición elemental de los frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha. Cenicafé 57 (4), 251-261.

Salazar Arias, N. (1977). Respuesta de plántulas de café a la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio. Cenicafé 28 (2). 61-66.

Serna G., S.L., Efecto de la inoculación conjunta con hongos micorrizales y microorganismos solubilizadores de fósforo en plantas de aguacate. (2013). Tesis M.Sc en Geomorfología y Suelos. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 86p.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2 (1), 587.

Shoji, S., & Takahashi, T. (2002). Environmental and agricultural significance of volcanic ash soils. Global environmental research-english edition, 6 (2), 113-135.

Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2017). Plant response to strigolactones: Current developments and emerging trends. Applied Soil Ecology, 120, 247-253.

Stewart, W.; Hammond, L., L.; & Kauwenbergh, V., S. T. (2005). Phosphorus as a natural resource. In: Phosphorus: agriculture and the environment. Sims, J.T.; & Sharpley, A.N. (Ed.). Editado En: Wisconsin (Estados Unidos), ASA - CSSA – SSSA.

Suárez, C., C. (2008). Mercado mundial de fertilizantes de nitrógeno, fósforo y potasio. In: Integración nacional sobre nutrición y fertilización de café I. San Andrés (Colombia). Julio 15 al 18. (Conferencia magistral).

Sewnet, T. C., & Tuju, F. A. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with shade trees and Coffea arabica L. in a coffee-based agroforestry system in Bonga, Southwestern Ethiopia. Afrika Focus, 26 (2), 111-131.

Sylvia, M., D.; Fuhrman, J., J.; Hartel G., P.; & Zuberer, A., D. (1999). Principles and applications of soil microbiology. editado en: Estados Unidos. 550p.

Uribe-Henao, A., & Mestre-Mestre, A. (1976). Efecto del nitrógeno, el fósforo y el potasio sobre la producción de café. Cenicafé (Colombia) 27(4):158-173.

Velásquez, G., Ngo, P. T., Rumpel, C., Calabi-Floody, M., Redel, Y., Turner, B. L., & de la Luz Mora, M. (2016). Chemical nature of residual phosphorus in Andisols. Geoderma, 271, 27-31.

Vera, D. F., Pérez, H., & Valencia, H. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de araza (Eugenia stipitata, Myrtaceae). Acta Biológica Colombiana, 7 (1), 33-40.

Villareal P.; D. 1997. Efecto de /Glomus etunicatum/ y /Bradyrhizobium/ spp. en almácigos de café /Coffea arabica/ L. var. Colombia solos y en asociación con /Arachis pintoi/ Krap. y Greg. Manizales (Colombia), Universidad Católica de Manizales. Programa de Maestría en Ciencias, 1997.

Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Molecular plant. 10 (9), 1147-1158. doi: 10.1016/j.molp.2017.07.012.

Wendling, L. A., Blomberg, P., Sarlin, T., Priha, O., & Arnold, M. (2013). Phosphorus sorption and recovery using mineral-based materials: sorption mechanisms and potential phytoavailability. Applied geochemistry,37, 157-169.

Xiao, C. Q., Chi, R. A., Huang, X. H., Zhang, W. X., Qiu, G. Z., & Wang, D. Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering*, *33* (2), 187-193

Yadav, H., Gothwal, R. K., Nigam, V. K., Sinha-Roy, S., & Ghosh, P. (2013). Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacterium Brevibacillus sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2 (3), 217-225.

Zahir, Z. A., Arshad, M., & Frankenberger, W. T. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy, 81, 97-168.

Zhao, L.; Zhang, Y. Q. (2015). Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of Trichoderma asperellum Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, *14* (8), 1588-1597.

Zhang, F., Kang, S., Zhang, J., Zhang, R., & Li, F. (2004). Nitrogen fertilization on uptake of soil inorganic phosphorus fractions in the wheat root zone. Soil Science Society of America Journal, 68 (6), 1890-1895.

Zayed, G., & Abdel-Motaal, H. (2005). Bio-active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea. Bioresource technology, 96 (8), 929-935.

Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of The Total Environment, 612, 522-537.

3. Capítulo 2. Capacidad de fijación de fosfato en suelos de la zona cafetera Colombiana

3.1 Resumen

La disponibilidad de fósforo (P) para las raíces de los cultivos está en función de la capacidad que tenga el suelo para fijarlo. Esta característica depende de las propiedades químicas y mineralógicas que son heredadas en buena parte del material parental. La caficultura de Colombia se desarrolla en una amplia diversidad de suelos, por tal razón, se llevó a cabo un estudio de la fijación de P en nueve suelos contrastantes en su génesis y características químicas. A través de la metodología de isotermas de adsorción, se evaluó la fijación de P, la cantidad del elemento requerida para alcanzar el nivel teórico P 0.2 en la solución del suelo y se estableció la equivalencia de dichos resultados con la metodología Bray II. El P0.2 se alcanzó entre 99 y 691 mg L^{-1}en suelos derivados de cenizas volcánicas correspondiendo la mayor fijación con los altos contenidos de materia orgánica (>12%) y menor porcentaje de arenas (49%). Para los suelos derivados de otro material parental, el P 0.2 que se alcanzó con concentraciones de P entre 36 y 437 mg L-1, fue explicado en función de los niveles de materia orgánica y la concentración de Al soluble. Los modelos de regresión calculados permitieron predecir que los citados niveles son equivalentes cuando el P según Bray II están entre 1.3 y 30 mg kg^{-1}. Estos resultados indican que hay la posibilidad de efectuar ajustes a la recomendación de fertilizantes fosfóricos para el cultivo del café de acuerdo con la capacidad de fijación de P que presente el suelo.

3.2 Introducción

El fósforo (P) es un elemento clave para los cultivos (Zhu *et al*., 2018) y para el de café en particular, sus mayores requerimientos se centran en las fases de vivero y crecimiento vegetativo (Ávila *et al.* 2007; Sadeghian, 2008). A pesar que durante la etapa reproductiva se requiere en menor proporción que otros, es un nutriente importante para el desarrollo de flores y frutos y demás estructuras vegetales tales como ramas, hojas y raíces (Sadeghian *et al.,* 2007). Para satisfacer las necesidades del cultivo, en el país se consume regularmente 300 000 t de fertilizante por año (Agrocafé, 2014), que en promedio contienen un 5% de P_2O_5. En términos equivalentes al DAP (fosfato diamónico) esto representa un consumo de 30000 t año^{-1}, en la actualidad (2018) esto representa 42,000 millones de pesos por año.

Las recomendaciones para la fertilización con P pueden hacerse de manera general sin considerar el contenido disponible del elemento en el suelo (Minten *et al.,* 2017), o basarse en los resultados del análisis de laboratorio. En Colombia, se ha implementado el método de Bray II (Bray Kurtz, 1945), en el cual la solución extractora (NH_4F + HCl) remueve, en un tiempo corto (40 s), formas del elemento unidas al Ca (vía disolución con H^+) y a las arcillas (vía desorción F^-), donde el P débilmente ligado a los coloides del suelo es liberado.

En condiciones de Uganda, Wang *et al.,* (2015) asocian las mayores producciones de café cuando el nivel de P en el suelo es inferior a 30 mg kg^{-1}: Para Colombia, Cenicafé ha propuesto de manera general que para las fases de crecimiento y producción el mismo valor logrado a través de la técnica P-Bray II (Sadeghian, 2008). En la etapa de almácigo o vivero se recomienda aplicar P independientemente del tipo de suelo y del nivel de P que este tenga (Díaz *et al.,* 2008), aún cuando se suministra abono orgánico que contiene P (Ávila *et al.,* 2007). Pese a esto, los valores establecidos han sido objeto de ajuste permanente en virtud de las variaciones en la respuesta al suministro de P en diferentes suelos y en las diversas variedades de café. Se sospecha entonces que en algunos casos se puede estar fertilizando cuando no es necesario y en otros, por el contrario, la fertilización puede ser insuficiente.

Se sabe que el P (como ión fosfato, $H_2PO_4^-$) se mueve hacia las raíces principalmente por difusión (Mundus *et al.*, 2017; Dijkstra *et al.*, 2016), razón por la cual la cuantificación del nutrimento en la fase sólida (vía el método de Bray II) y en la solución del suelo (vía $CaCl_2$ 0,01 M ó H_2O) sería ideal para predecir con mayor nivel de precisión los requerimientos de fertilización (Hue y Fox, 2010). Varias propuestas metodológicas se han desarrollado para refinar la comprensión de la dinámica del elemento en el sistema suelo-planta (Yan *et al.,* 2017, Bhattacharyya *et al.*, 2015; Shafqat y Pierzynski, 2014; Gauthman y Prabhakar, 2012), particularmente en suelos donde los métodos tradicionales de laboratorio no correlacionan satisfactoriamente con la respuesta del cultivo.

Una de estas propuestas se basa en el uso de isotermas de adsorción de P (Hue y Fox, 2010; Fox and Kamprath, 1970). En estas se establece la relación que hay entre la cantidad de P aplicado, la que es adsorbida por el suelo y aquella que queda en la solución del suelo para ser absorbida por las raíces de las plantas. Las proporciones entre estos son variables y dependen principalmente de factores como la mineralogía dominante en la fracción arcilla, la cantidad de arcilla y la presencia de iones libres de Fe^{3+}, Al^{3+} y Ca^{2+}. En general, se ha establecido que la concentración de P en solución de 0.2 mg L^{-1} como satisfactoria para alcanzar altos rendimientos en muchos cultivos de interés agronómico. De ahí que en las isotermas se calcule el índice $P_{0,2}$, el cual refleja la cantidad de P (mg kg^{-1}) a aplicar para alcanzar una concentración de P en solución de 0.2 mg L^{-1}. Este índice ha sido usado como un indicador de la capacidad de un suelo para fijar P. Sin embargo, es claro que algunos pueden requerir concentraciones menores (p.e., caña de azúcar 0.1 mg L^{-1}; yuca 0.05 mg L^{-1}) o mayores (p.e., lechuga 0.3 mg L^{-1}). De esta forma se puede estimar cual es la cantidad que se debe aplicar a un suelo dado para obtener la concentración deseada (Hue y Fox, 2010).

En varios experimentos se ha demostrado que el café crece satisfactoriamente a la concentración de P soluble de 0.2 mg L^{-1} (Cuervo, 2017; Jaramillo y Osorio, 2009). Sin embargo, se ha detectado que en presencia de la asociación micorrizal adecuada, el requerimiento de P en solución se ha reducido a 0.02 mg L^{-1} (Habte y Bittenbender, 1999), tal como se ilustrará en el capítulo 3.

En vista de la alta diversidad de suelos en los cuales se cultiva el café, donde es posible encontrar diferencias en su génesis y mineralogía del suelo, que gobiernan la fijación de P (Fink *et al.* 2016; Juo and Fox, 1977), es necesario refinar la predicción de la respuesta del

cultivo a la aplicación de fertilizantes fosfóricos. Así, se podría generar recomendaciones de fertilización fosfórica más ajustadas, tendientes a la reducción de los costos ambientales y de producción. Igualmente, resultaría muy útil conocer la relación entre el P Bray II y el P soluble, al tiempo de efectuar extrapolaciones entre ellos. Cabe la pregunta si estas relaciones son específicas para cada suelo o grupo de suelos (p.e., Andisoles, Inceptisoles, etc.)

De esta manera, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de fijación de P en suelos de la zona cafetera de Colombia contrastantes en su génesis y fertilidad, y su relación entre la concentración de P extraída por el método de Bray II.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Sitio

Este estudio se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) en la sede Plan Alto, ubicado en el Municipio de Chinchiná, Caldas, Colombia (5°15´34” N, 75°15´34”W) a una altitud de 1430 m.

3.3.2 Suelos

Se seleccionaron suelos de nueve unidades de mapeo de la zona cafetera colombiana basados en su importancia por área sembrada en café y por presentar contrastes en su material parental de origen. Datos relevantes de los suelos se presentan en la Tabla 3-1. En los suelos derivados de cenizas volcánicas también se consideró la distancia del sitio con respecto a la fuente de emisión de las cenizas. Esto supone que al aumentar la distancia exista materiales más finos y, por ende, una mayor superficie específica, lo cual se puede reflejar en una mayor capacidad de fijación de P.

Para cada unidad de suelos se seleccionó un lote de tradición cafetera, es decir cultivado con café por un tiempo no inferior a 10 años. En cada plantación se tomaron con barreno 10-15 submuestras de suelo superficial (horizonte A, 0-20 cm) en las calles de la plantación, suficientes para reunir aproximadamente 2.0 kg. El suelo colectado se llevó al

laboratorio de suelos de Cenicafé, se secó al aire hasta humedad <5%, se pasó por un tamiz de 2 mm y se retuvo en un tamiz de 0.5 mm. Luego de esto, aproximadamente 50 g se utilizaron para los análisis de fijación de P mediante isotermas de adsorción. Adicionalmente, submuestras del suelo se sometieron a análisis físico- químico en el laboratorio (Tabla 3-2).

Tabla 3-1. Localización y tipo de suelos objetos de estudio.

Unidad de Suelos	Área de influencia (Departamento)	Material Parental	Taxonomía (USDA)	Sitio muestreo Departamento (Municipio) / Vereda
Chinchiná	Chinchiná, Caldas, Risaralda, Antioquia, Quindío	Cenizas volcánicas	Fulvudand	Caldas (Chinchiná)/ La quiebra
Timbío	Cauca	Cenizas volcánicas	Melanudand	Cauca (Timbío)/ San Joaquín
Líbano	Tolima	Cenizas volcánicas	Melanudand	Tolima (Líbano)/ La trinidad
Doña Juana	Nariño	Cenizas volcánicas	Hapludand	Nariño (La unión)/ Bellavista
Quindío	Quindío, Tolima	Cenizas volcánicas	Udivitrand	Quindío (Buenavista)/ Río verde
Doscientos	Caldas, Quindío, Risaralda, Antioquia, Valle del Cauca, Cauca	Roca Ígnea	Eutropept	Valle (Jamundí)/ sin dato
Suroeste	Antioquia	Aglomerados		Antioquia (Fredonia)/ El calvario
San Simón	Huila, Tolima	Roca Ígnea	Dystrudept	Tolima (Ibagué)/ El colegio
Ropero	Santander, Cundinamarca, Boyacá	Roca Sedimentaria	Dystropept	Santander (El Socorro)/ La honda
Llano de Palmas	Santander, Cundinamarca	Roca Sedimentaria	Dystropept	Santander (El Socorro)/ Árbol solo

Tabla 3-2. Propiedades físicas y químicas de los suelos bajo estudio.

variable / suelo		Chinchiná	Timbío	Líbano	Doña Juana	Quindío	Doscientos	San Simón	Ropero	Llano Palmas	Suroeste
pH (agua)		4,6	5,2	5,2	5,2	5,2	5,0	5,2	4,9	4,5	4,4
pH (KCl 0.1M)		4,0	4,4	3,0	4,9	4,5	4,4	3,6	3,4	3,5	3,5
Δ pH		0,6	0,8	2,2	0,3	0,7	0,7	1,7	1,5	1,0	0,9
M. Orgánica	%	12,3	17,6	13,4	7,7	6,2	14,4	5,0	6,3	5,7	14,4
P	$mg.kg^{-1}$	2,4	3,7	3,0	34,0	5,0	13,0	8,9	4,2	7,0	34,0
Acidez		1,9	0,5	0,7	0,4	0,4	0,4	0,2	2,0	1,5	8,2
CICE	$cmol_c.kg^{-1}$	2,3	7,6	2,6	5,0	3,7	4,1	12,9	7,1	4,8	9,0
Al		0,8	0,5	0,6	0,2	0,6	0,4	0,2	1,7	1,4	7,0
Arcilla		20	22	11	16	14	26	28	45	39	34
Arena	%	54	46	46	67	67	62	50	28	40	50
Limo		26	32	43	17	19	12	23	27	21	16

Métodos: pH en agua (1:1, P:V) y pH en KCl 1 M medidos con potenciómetro; Materia orgánica (MO): Walkley y Black; P (Bray II); CICE por suma de cationes de cambio; Al intercambiable y acidez intercambiable: KC 1 M; arena, limo, y arcilla medidos por el método de Bouyoucos. ΔpH: Diferencia pH en KCl 0.01M y pH en agua; CICE: suma de bases y Al.

3.3.3 Isotermas de adsorción de P

Tiempo de incubación

Previo al análisis de las isotermas para los suelos objeto de estudio, se llevó a cabo una evaluación del tiempo de incubación requerido para alcanzar el equilibrio entre el P-adsorbido y el P-en solución, momento en el cual se adsorbe una mayor proporción de fosfato adicionado. Para tal fin, 3 g de suelo (base seca) del suelo de la unidad Chinchiná se transfirieron a los viales de 50 mL y se adicionó el equivalente a 1000 mg kg^{-1} con una solución de KH_2PO_4 disuelto en 0.01 M de $CaCl_2$. Se suministraron tres gotas de tolueno y los viales y sus contenidos se agitaron 30 min cada 12 h por 6.5 d. Cada 12 h se determinó la concentración de P por el método de Murphy y Riley (1962). Con este método se toman 10 mL del filtrado y se adicionan 2.5 mL de la solución B (0.428 g de L-acido ascórbico diluido en 100 mL de la solución A); la solución A está compuesta por 0.35 g de tartrato de antimonio y potasio, 168 mL de ácido sulfúrico concentrado y 14.43 g de molibdato de amonio, diluidos con agua desionizada hasta completar 3.0 L.

Para efectos de calibración del espectrofotómetro, se preparan soluciones estándar de P de 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg L^{-1}, a las cuales también se les adicionaron la solución B. Luego de 20 minutos requeridos para la formación y estabilización del color azul, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 890 nm (máxima absorbancia).

Método de isotermas de adsorción

A través del método propuesto por Fox y Kamprath (1970) se evaluó la capacidad de fijación de P de los suelos. En breve, esto consistió en tomar por triplicado 3 g (base seca) de la muestra previamente tamizada (0.5-2.0 mm) y transferirla a un vial plástico de 50 mL de capacidad. Luego, se adicionan cantidades crecientes de P a razón de 0, 60, 125, 250, 50, 1000 y 2000 mg kg^{-1}; como fuente de P se usó KH_2PO_4 diluido en 30 mL de $CaCl_2$ 0.01 M. Posteriormente, se adicionaron 3 gotas de tolueno para inhibir la actividad de los microorganismos presentes. Los viales se agitaron durante 30 minutos, cada 12 horas por 6 días continuos.

Determinación de P en solución

Al final del periodo de incubación, los viales se centrifugaron a 4500 r.p.m. por 10 minutos. Luego, el sobrenadante se pasó a través de un papel filtro Whatman No. 42. En alícuotas del filtrado se determinó la concentración de P por el método del azul de fosfomolibdato - ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962). tal como se explicó previamente.

Una vez medida la capacidad de fijación de P, los suelos se agruparon de acuerdo con las siguientes categorías basadas en el valor $P_{0.2}$ (mg/kg): <250 muy baja (MB), 250-500 baja (B), 500-750 media (M), 750-1000 alta (A) y >1000 muy alta (MA). Lo anterior corresponde a una modificación de la propuesta original de Juo y Fox (1977).

El suelo resultante de la prueba de fijación se lavó con 30 mL de solución de $CaCl_2$ 0.01 M, luego se secó en estufa a 65°C durante 24h, posteriormente se determinó la concentración del P extraída por el método de Bray II. Con estos valores se hicieron análisis de correlación y regresión entre el P-Bray II y el P soluble.

El análisis de los resultados se basó en la estimación del promedio, error estándar y el ajuste de la expresión que describiera el comportamiento del P en solución en función del P aplicado para la variable P soluble, y determinar el valor $P_{0.2}$ y $P_{0.1}$.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Tiempo de incubación

Los resultados indican que la concentración de P en solución cambia en función del tiempo. De esta manera, a las 16 h después de aplicada la solución de KH_2PO_4, la concentración de P en solución fue de 0.82 mg L^{-1}, lo cual indica que el 99.8% del P adicionado ya se había fijado (Figura 3-1). La concentración continúo decreciendo con el paso del tiempo y a las 36 h fue de 0.41 mg L^{-1} (fijación de 99.6%). A partir de ese punto los cambios en la concentración fueron de menor magnitud. A las 60 h la concentración de P en solución fue de 0.27 mg L^{-1} (99.7%). En adelante, la concentración de P no cambió descriptivamente, presentándose valores que fluctuaron entre 0.18 y 0.22 mg L^{-1}, que equivalen a fijaciones de 99.78 – 99.82 % (Figura 3-1).

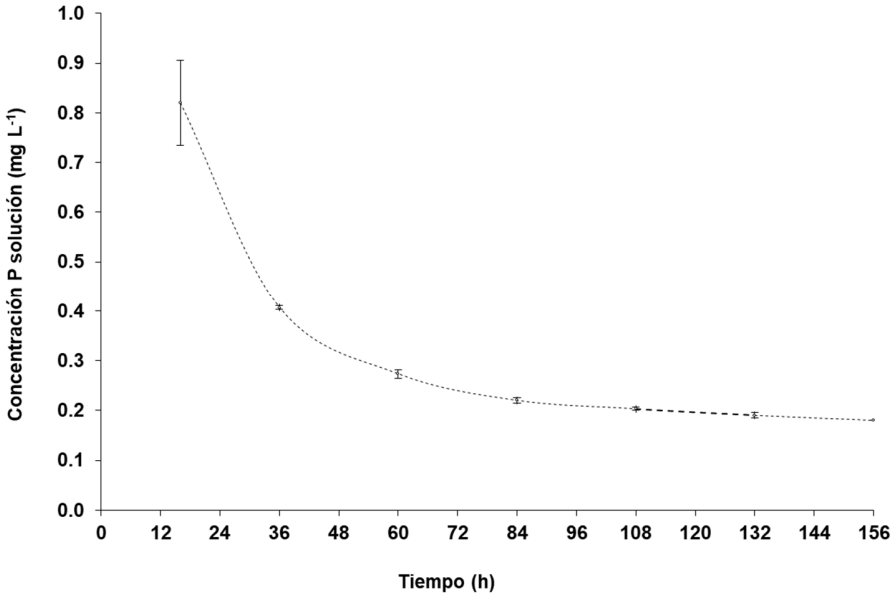


Figura 3-1. Concentración de P en solución en función del tiempo de incubación luego de la aplicación de una solución de KH_2PO_4 a razón de 1000 mg kg^{-1}. Las barras indican error estándar.

Los datos pueden ser representados por el modelo que se describe a continuación:

$$P \text{ en solución (mg } L^{-1}) = 1 / (0.4754 + 0.0479 * t)$$

Donde, t = tiempo de incubación (h); r^2= 0.99; CME= 0.0017; P <0.001.

Si bien la tendencia descrita permite detectar en función del error estándar estimado, una estabilización temprana en los valores de P en solución, equilibrar el suelo en intervalos de tiempo inferiores a 5 días puede generar un mayor grado de incertidumbre en la confiabilidad de los resultados. Por lo anterior se recomienda un período de incubación de 6 a 7 días; particularmente si se quieren aprovechar las calibraciones de interés agronómico hechas con estas mediciones. Los resultados coinciden con Fox y Kamprath (1970) quienes hallaron para un Ultisol de Estados Unidos que la concentración de P se equilibró entre los 4 y 6 días después de la aplicación de P. Cao *et al.* (2017), Shafquat y Pierzynski (2014) y Gauthan y Prabhaker (2012) emplean tiempos de incubación muy inferiores a los del presente estudio (< 48 h) para estudiar la adsorción a través de los modelos cásicos de Freundlich y Langmuir.

3.4.2 Isotermas de adsorción

La magnitud en la retención de fosfatos fue diferente entre suelos (Figura 3-2, Figura 3-3, y Tabla 3-4, Tabla 3-5). Dentro del grupo de los suelos derivados de cenizas volcánicas, los modelos estadísticos estimados permitieron destacar al suelo de la unidad Líbano como el de mayor capacidad de fijación con un valor de $P_{0.2}$ de 691 mg kg^{-1}, seguido por los suelos de las unidades Chinchiná, Timbío, Quindío y Doña Juana con valores de 619, 615, 374 y 99 mg kg^{-1}, respectivamente.

Tabla 3-3. Clasificación de los suelos de acuerdo a la cantidad de P requerida para alcanzar la concentración $P_{0.2}$ en solución.

Suelo (Unidad)	$P_{0.2}$ (mg kg^{-1})*	Clasificación Juo y Fox (1977)
Chinchiná	619	Alta
Líbano	690	Alta
Timbío	615	Alta
Quindío	374	Media
Doña Juana	99	Baja
Doscientos	438	Media
Suroeste	136	Media
San Simón	36	Baja
Ropero	276	Media
Llano Palmas	235	Media

* Cantidad de fosforo requerida para obtener en la solución del suelo una concentración de 0.2 mg L^{1}.

El ajuste de las tendencias para cada suelo, correspondió a una expresión de tipo exponencial de la forma $f(y)= a(b)^{x}$, donde:

f(x): Cantidad de P aplicada

a y b: coeficientes de la función

x: $P_{0.2}$

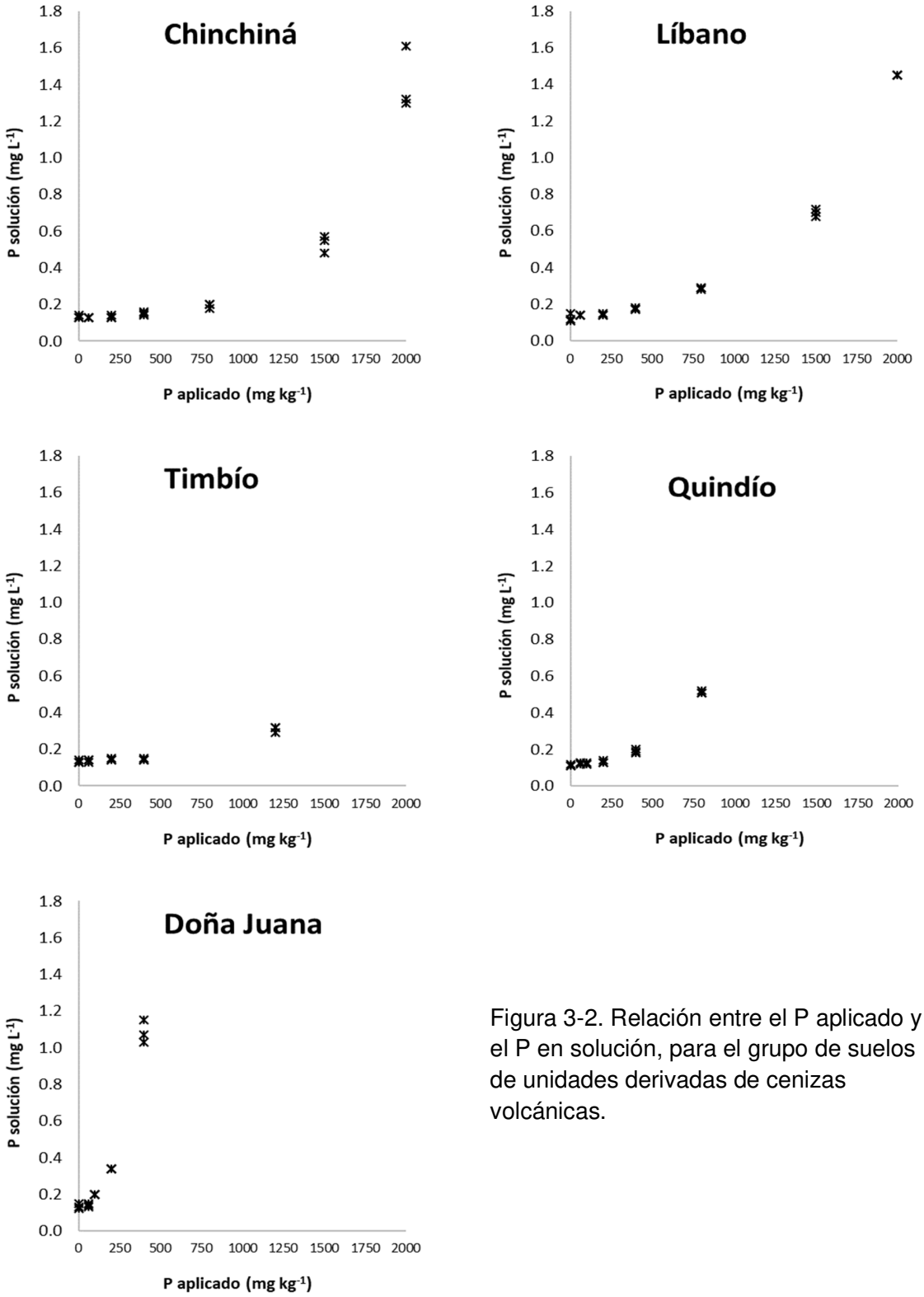


Figura 3-2. Relación entre el P aplicado y el P en solución, para el grupo de suelos de unidades derivadas de cenizas volcánicas.

Como se muestra en la Figura 3-2 y los coeficientes de las ecuaciones en la Tabla 3-5, para los suelos de origen diferente a las cenizas volcánicas, el valor de $P_{0.2}$ estuvo entre 36 y 276 mg kg^{-1} a excepción del suelo de la unidad Doscientos, el cual presentó un tenor cercano al de los derivados de cenizas volcánicas anteriormente citados, en este caso 437 mg kg^{-1}. Dicho resultado, puede asociarse a la posibilidad de que en tal suelo se presenten trazas de materiales amorfos provenientes de cenizas volcánicas presentes en su perfil. Condición que puede sustentarse en el alto contenido de materia orgánica (MO >14%) y a que su ubicación coincide con las franjas medias y bajas de la vertiente, en las cuales se puede depositar materiales arrastrados por agua desde las franjas altas donde están los depósitos de cenizas volcánicas según los registrado por González, (2013). Este mismo comportamiento puede presentarse en el suelo de Suroeste, dada la posición geográfica en donde aparece y sus altos contenidos de MO. Sin embargo, la diferencia en la cantidad de P requerida para el $P_{0.2}$ respecto a la Unidad Doscientos, puede estar relacionada con el nivel inicial de P en el suelo, el cual pudo deberse al efecto residual de fertilizaciones fosfóricas adicionadas.

Se ha considerado que la fijación de P en Andisoles se presenta en las superficies activas de los minerales silicatados amorfos y en óxidos de Fe y Al (Shoji y Takahashi, 2002). Los resultados del análisis de rayos x realizado para un estudio de González y Sadeghian (2012) en los mismos perfiles de suelos de la presente investigación y que corresponden a las unidades Chinchiná y Quindío, indicaron que en ambos hay trazas de vidrio volcánico (<5%), andesita, hiperstena y circón. Mayores contenidos (6-15%) de magnetita, cuarzo y granos alterados. Lo más relevante es que el suelo de Chinchiná presentó un material no-cristalino superior al 50%, el cual es dominante en su mineralogía, mientras que el suelo de Quindío su contenido fue de 30 a 50%. Esta diferencia explica en buena parte los niveles de fijación de P por ambos suelos. Según Schulze (2002), entre los materiales amorfos más frecuentes en este tipo de suelos se encuentra la alofana, la cual está compuesta por Si^{4+}, Al^{3+}, O^{-} y OH^{-} cuyo arreglo en el mineral expresa su comportamiento.

Otros factores, además de la mineralogía pueden explicar las diferencias entre los suelos. Para Chinchiná, Líbano y Timbío, los cuales corresponden a los tres primeros suelos en fijación de P (entre 615 y 690 mg kg^{-1}), los niveles de MO son muy altos (>12%) y el contenido de arena (en promedio 49%) es menor que en los otros Andisoles. En contraste, los dos suelos restantes de este grupo (Quindio y Doña Juana) con menor capacidad de

fijación de P, los contenidos de MO son inferiores (6.2 y 7.7%) y poseen mayor porcentaje de arenas (67%).

Lo mencionado puede explicarse debido a que la alta superficie especifica de la alofana (257-374 m^2 g) (Huang *et al.*, 2016) en combinación con las cargas positivas que exhibe la MO pueden generar complejos orgánico-minerales estables a la biodegradación. Como resultado, la MO impediría la formación de cristales manteniendo los materiales con poco rango de ordenación (amorfos, no-cristalinos) y con mayor superficie específica para adsorber P (Yan *et al.* 2017; de Campos *et al.* 2016; Pizzeghello *et al.* 2014; Peña Ramírez *et al.* 2009). Igualmente, con la MO se podría formar complejos con iones de Fe y Al (MO-Fe^{3+}, MO-$Fe(OH)^{2+}$, (MO-Al^{3+}, MO-$Al(OH)^{2+}$ que igualmente pueden adsorber P. Note que en promedio los Andisoles con mayor fijación hay más acidez intercambiable y Al (Tabla 3-2). Igualmente, se resalta que el ΔpH (agua)-pH(KCl) es descriptivamente mayor en Chinchiná, Líbano y Timbío que en Quindío y Doña Juana.

Jalali y Jalali (2016), hallaron rangos de máxima capacidad de fosfatos entre 99 to 4406 mg kg^{-1}, en suelos de Portugal y encontraron que dicho fenómeno era explicado significativamente por los niveles de MO.

De otro lado, la MO inhibiría la fijación cuando se encuentra en un estado bajo de humificación o en camino de descomposición, debido a que los aniones orgánicos generados durante este proceso podrían competir por los sitios que pueden ser potencialmente ocupados por el elemento (Yan *et al.*, 2017; Bhattacharyya *et al.*, 2015; Shafquat y Pierzynski, 2014).

Para el grupo de suelos cuyo origen es diferente a las cenizas volcánicas, el $P_{0.2}$ se alcanzó con aplicaciones de 437 $mg.kg^{-1}$ en Doscientos, 256 $mg.kg^{-1}$ en promedio para Ropero y Llano Palmas, así como 136 y 36 $mg.kg^{-1}$ en Suroeste y San Simón, respectivamente (Figura 3-3).

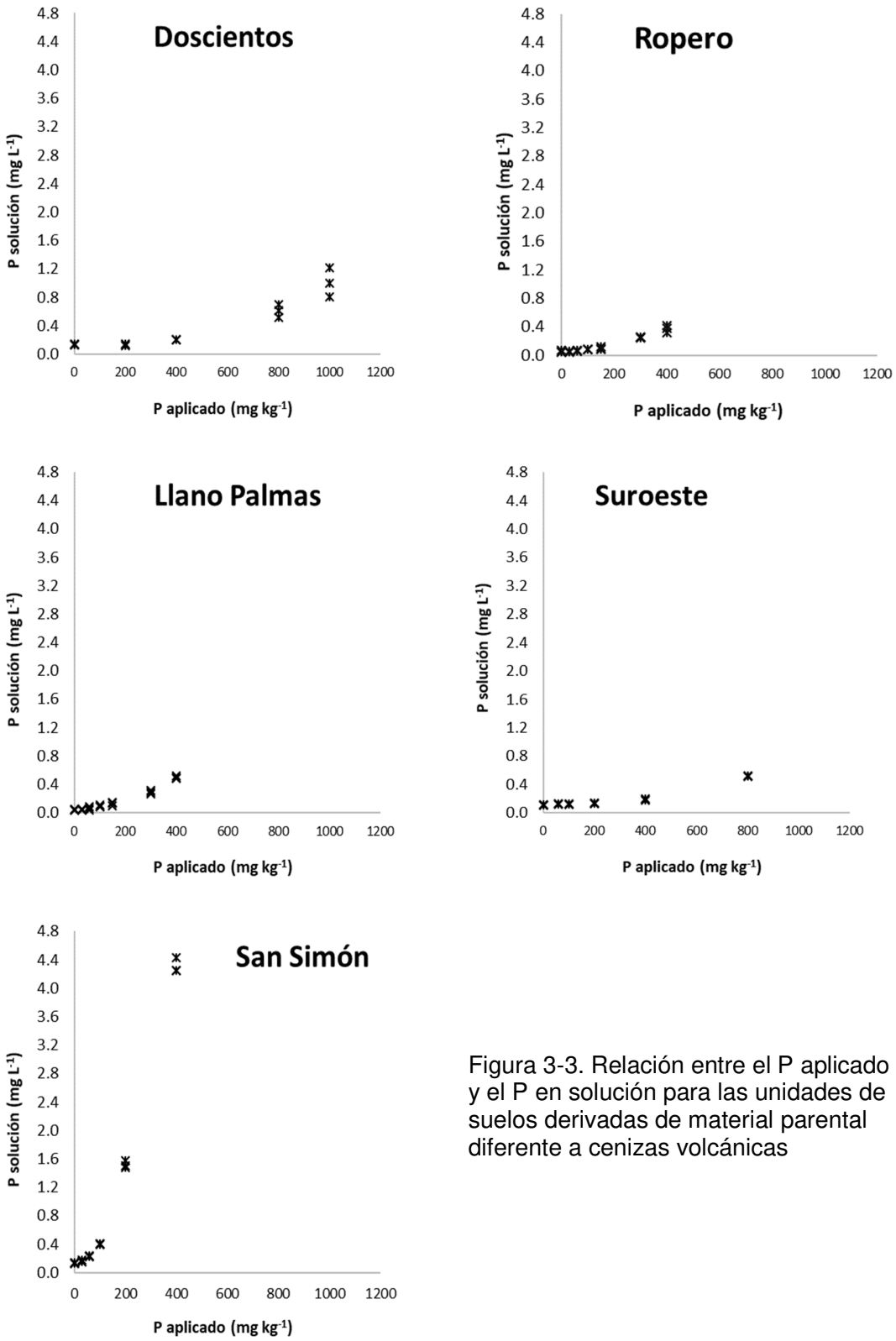


Figura 3-3. Relación entre el P aplicado y el P en solución para las unidades de suelos derivadas de material parental diferente a cenizas volcánicas

Tabla 3-4. Coeficientes de la función calculada para los suelos objeto de estudio.

Suelo	Parámetros			
	a	b	Suma cuadrados	R^2
Chinchiná	0.00±0.01	1.00±0.00	0.14	0.97
Líbano	1.00±0.00	1.00±0.00	0.01	0.99
Timbío	0.12±0.05	1.00±0.00	0.03	0.98
Quindío	0.09±0.05	1.00±1.00	0.03	0.96
Doña Juana	0.11±0.07	1.00±0.01	0.01	0.99
Doscientos	0.28±0.02	1.00±0.00	0.11	0.94
Ropero	0.05±0.00	1.00±0.00	0.01	0.97
Llano Palmas	0.05±0.00	1.00±0.00	0.01	0.99
Suroeste	0.12±0.00	1.00±0.00	0.73	0.97
San Simón	0.28±0.04	1.00±0.00	0.90	0.98

El alto valor de $P_{0.2}$ en las Unidades Doscientos y Suroeste, puede estar asociado con la presencia de cenizas en su perfil, como consecuencia del arrastre desde sitios altos de la vertiente o por la persistencia de materiales amorfos en puntos donde alguna vez hubo depósitos de este material parental. Dicha situación se sustenta en el hecho de que el afloramiento de estas unidades suelo se presenta en las áreas de la zona cafetera correspondientes con las franjas medias y bajas de la vertiente, especialmente en puntos cuya porción superior de la vertiente, conserva suelos derivados de cenizas volcánicas o mantos de dicho material, en sus horizontes subyacentes (González, 2013). De allí que presenten altos contenidos de MO; sin embargo, tal como se presentó en la Unidad de suelos Doña Juana, las diferencias en el tamaño y origen de las mencionadas cenizas, pueden estar explicando la diferencia de retención de P en ambos suelos.

Para los suelos de Llano Palmas y Ropero, que presentaron contenidos de MO relativamente bajos (5.7 y 6.3%, respectivamente), se esperaría una mayor fijación de P a la registrada, dado que el alto porcentaje de arcillas que poseen (entre 39 y 45%) derivaría una mayor superficie específica en sus coloides y porque el valor del delta de pH calculado,

sugiere un predominio de cargas positivas por satisfacer. Sobre el tema en particular, Shafqad y Pierzynski (2014) encontraron en suelos con altos porcentajes de arcillas que el fenómeno de fijación de P puede presentarse, pero con bajas cantidades del elemento. Adicionalmente, dado que el Al soluble participa activamente en el fenómeno que se discute (Chen y Liao, 2016), es posible que los altos contenidos del ion metálico en estos dos suelos complementen la fijación de P.

Para San Simón, no se encontró correspondencia entre el fenómeno objeto de estudio y las características del suelo; sin embargo, es de anotar que dicho suelo al provenir de una roca granodiorita, genera suelos arenosos cuyo tamaño de arenas están entre 2 y 1.0 mm, que las cataloga como arena gruesa, y por consiguiente son suelos con una baja superficie específica. De allí que presente el valor más bajo de $P_{0.2}$ observado entre los suelos estudiados. Sobre el tema en particular Arai y Livi (2013) sostienen que la fracción arenosa de algunos suelos podría exhibir una reactividad para adsorber P, más que por su tamaño, en virtud de su configuración en términos de aluminosilicatos ricos en Fe.

De acuerdo con los resultados del $P_{0.2}$ obtenidos en la totalidad de suelos analizados, si se considera que el suelo de Líbano alcanza la concentración $P_{0.2}$ con la dosis de P de 691 mg kg^{-1}, es decir con el más alto nivel dentro del grupo de suelos evaluados, las recomendaciones de fertilización con el nutrimento para el cultivo del café en función del nivel del tipo de suelo y, por ende, de su capacidad de fijación, teóricamente podría reducirse hasta en un 95% (Tabla 3-5).

Tabla 3-5. Fijación relativa de la concentración de P aplicado de acuerdo al nivel $P_{0.2}$ en los suelos evaluados en comparación para el suelo de Líbano (100%).

Suelo	Valor relativo (%)
Líbano	100
Chinchiná	90
Timbío	89
Doscientos	67
Quindío	54
Ropero	40
Llano Palmas	34
Suroeste	20
Doña Juana	14
San Simón	5

Las mencionadas cantidades podrían ser modificadas en la medida de que se efectúen precisiones en cuanto al nivel de P en solución que sea requerido de acuerdo con la variedad, el estado de desarrollo del cultivo o la estrategia biotecnológica que se esté desarrollando. Sobre este aspecto, se ha demostrado que la concentración de P de 0.2 mg L^{-1} en solución se ha definido como nivel base para establecer recomendaciones para promover el crecimiento de almácigos de café en presencia de hongos formadores de micorrizas (Cuervo, 2017; Osorio y Habte, 2015; Jaramillo y Osorio, 2009; Habte y Bittenbender, 1999).

3.4.3 P en solución vs. P Bray II

Consecuentemente con lo anterior, en vista que el procedimiento de estimación del $P_{0.2}$ hace referencia a la concentración de P en la solución del suelo resultante luego de que los sitios de adsorción de P han sido ocupados en su totalidad, se requiere definir un índice de uso común que asociado a los niveles que se vienen discutiendo, que conduzca al aseguramiento de una mayor efectividad de los planes de fertilización fosfórica.

Bajo las anteriores circunstancias a partir del método de laboratorio Bray II, el cual constituye actualmente la base fundamental para efectuar recomendaciones de fertilización con P en café en Colombia (Sadeghian, 2008), se establecieron las relaciones y los modelos a partir de los cuales puedan llegar a estimarse las cantidades mencionada. Este procedimiento permitió detectar una estrecha relación entre el P en solución y la concentración del elemento estimada por este método de uso común en los laboratorios del país (Figura 3-4 y Tabla 3-6), condición ratificada por los altos niveles de determinación obtenidos, los cuales estuvieron entre 0.84 y 0.99.

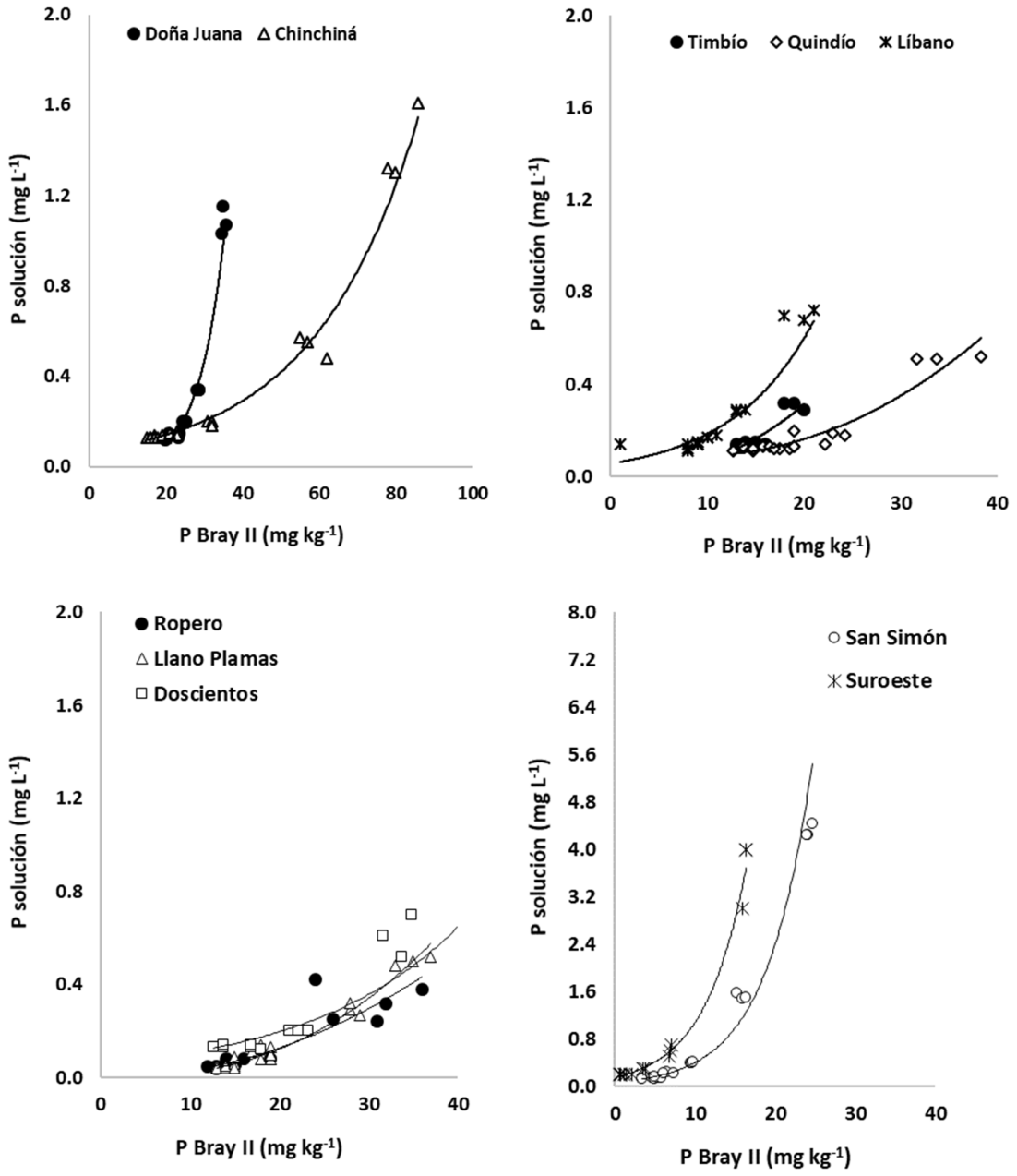


Figura 3-4. Correlación entre el P en solución y el determinado por Bray II para los suelos objeto de estudio

Con base en lo planteado, en siete de los suelos evaluados la concentración de P de 0.2 mg L^{-1} corresponde a valores de P-Bray II entre 16 y 30 mg kg^{-1}. Para los tres restantes suelos, esta concentración equivale en Bray II <11 mg kg^{-1}. Los modelos estimados

permitieron calcular el nivel de $P_{0,2}$, el cual correspondió a 30 mg kg^{-1} para el suelo de Chinchiná, 25 para Ropero, 23 en los suelos de Doña Juana, Quindío y Llano Palmas, 19 para la Unidad Doscientos, en tanto que 16, 11, 6 y 1.3 mg kg^{-1}, para los suelos de Timbío, Líbano, San Simón y Suroeste, respectivamente.

Del mismo modo, los valores de $P_{0.1}$ para Chinchiná, Líbano, Timbío, Quindío, Doña Juana y Doscientos fueron 9, 6, 12, 14, 22 y16 respectivamente y, 2, 19 y 18 para San Simón, Ropero y Llano Palmas. Para Suroeste no se presenta el resultado por tener un valor muy bajo.

Tabla 3-6. Modelos de regresión para la estimación del nivel de P en solución a partir del método Bray II.

Suelo	Modelo	R^2	$P_{0.1}$ estimado	$P_{0.2}$ estimado
Chinchiná	P Bray II (mg kg^{-1}) = 27.19 ln (P soluble) +73.43	0.99	9	30
Líbano	P Bray II (mg.kg^{-1})= 7.13 ln (P soluble)+ 22.22	0.84	6	11
Timbío	P Bray II (mg.kg^{-1})= 6.10 ln (P soluble)+ 26.16	0.85	12	16
Quindío	P Bray II (mg.kg^{-1})= 12.61 ln (P soluble)+ 43.08	0.89	14	23
Doña Juana	P Bray II (mg.kg^{-1})= 0.005 (P soluble)^2- 0.23 (P soluble) + 2.62	0,99	22	23
Doscientos	P Bray II (mg.kg^{-1})= -5.92 (P soluble)^2 + 36.64 (P soluble) + 12.30	0,99	16	19
Suroeste	P Bray II (mg.kg^{-1}) = 5.15 ln (P soluble) + 9.575	0,99	--	1.3
San Simón	P Bray II (mg.kg^{-1})= = 5.50 ln (P soluble) + 15.03	0.98	2.4	6
Ropero	P Bray II (mg kg^{-1}) = 8.95 ln (P soluble) +39.70	0.86	19	25
Llano Palmas	P Bray II (mg.kg^{-1})= -43.83 (P soluble)^2 + 70.21 (P soluble) + 11.00	0.98	18	23

Yost *et al.* (1981) sugieren que a partir de las isotermas de adsorción se puede determinar un equivalente de P extraído con otro método que permita alcanzar valores en solución y formular indicadores para la predicción de la eficiencia de la fertilización fosfórica. En condiciones de Brazil, Roy *et al.*, (2017), registan una significativa correlación entre el P fijado y la cantidad del elemento extraído por la técnica Bray I, indicando que la fijación de P puede ser útil para predecir las concentraciones del elemento en los suelos.

3.4.4 Implicaciones de los resultados

- Se demostró que aunque los suelos provengan del mismo origen de unidades derivadas de cenizas volcánicas, la capacidad de fijación de P difiere significativamente y que tanto la materia orgánica, el porcentaje de arenas, así como el nivel de Al solule explican satisfactoriamente el fenómeno.

- La recomendación de fertilizantes fosfóricos para café a escala regional, puede llvarse a cabo de acuerdo con la capacidad de fijación de P que presente el suelo.

3.5 Bibliografía

Agroinsumos del café S.A. - Agrocafé. (2014). Informe de gestión 2014. Informe de junta directiva. Bogotá (Colombia). 39p.

Arai, Y., & Livi, K. J. (2013). Underassessed phosphorus fixation mechanisms in soil sand fraction. Geoderma, 192, 422-429.

Avila, W., Sadeghian, S., Sanchez, P., & Castro, H. (2007). Producción de almácigos de café en el departamento de Santander con diferentes fuentes de materia orgánica y de fósforo. Avances tecnicos Cenicafé, 356, 1-12.

Bhattacharyya, P., Nayak, A. K., Shahid, M., Tripathi, R., Mohanty, S., Kumar, A., & Swain, C. K. (2015). Effects of 42-year long-term fertilizer management on soil phosphorus availability, fractionation, adsorption–desorption isotherm and plant uptake in flooded tropical rice. The Crop Journal,3 (5), 387-395.

Cao, X., Liu, X., Zhu, J., Wang, L., Liu, S., & Yang, G. (2017). Characterization of phosphorus sorption on the sediments of Yangtze River Estuary and its adjacent areas. Marine pollution bulletin, 114 (1), 277-284.

Chen, Z. C., & Liao, H. (2016). Organic acid anions: An effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils. Journal of Genetics and Genomics. 43 (11), 631-638

Cuervo, J. C. (2017). Dependencia micorrizal de variedades de café bajo diferentes concentraciones de fosfato soluble en el suelo. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Maestría en Geomorfología y Suelos. (Tesis de M.Sc). Medellín (Colombia). 92p.

de Campos, M., Antonangelo, J. A., & Alleoni, L. R. F. (2016). Phosphorus sorption index in humid tropical soils. Soil and Tillage Research, 156, 110-118.

Díaz, C., Sadeghian, S., & Morales, C. S. (2008). Cambios químicos ocasionados por encalamiento y uso de lombrinaza en la etapa de almácigo del café. Cenicafé 59 (4), 295-309.

Dijkstra, F. A., He, M., Johansen, M. P., Harrison, J. J., & Keitel, C. (2015). Plant and microbial uptake of nitrogen and phosphorus affected by drought using 15 N and 32 P tracers. Soil Biology and Biochemistry, 82, 135-142.

Fink, J. R., Inda, A. V., Bavaresco, J., Barrón, V., Torrent, J., & Bayer, C. (2016). Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. Soil and Tillage Research, 155, 62-68

Fox, R. L., & Kamprath, E. J. (1970). Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. Soil Science Society of America Journal, 34 (6), 902-907.

Gauthan P., J., Prabhakar, C. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. (2012). Journal of Contaminant Hydrology 129–130. 46–53.

Gonzalez O., H. (2013) Identificación de las principales unidades de suelos de la zona cafetera. p 269-283. En: Cenicafe. Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Chinchiná: FNC: CENICAFE, 3 vols.

Gonzalez O., H., Sadeghian K., S, (2012). Lixiviacipon de nitrógeno en suelos de la zona cafetera a partir de diferentes fuentes fertilizantes. Cenicafé 63(1):111-119.

Gonzalez O., H.; & Lince S., L.A. (2013) Suelos de la zona cafetera. p. 239-268. En: Cenicafe. Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Chinchiná: FNC: Cenicafe. 3 vols.

Hue, N.V.; Fox, R.L. Predicting Plant Phosphorus Requirements for Hawaii Soils using a Combination of Phosphorus Sorption Isotherms and Chemical Extraction Methods. (2010). Communications in Soil Science and Plant Analysis, 41:133–143.

Habte, M., & Bittenbender, H. C. (1999). Reactions of coffee to soil solution P concentration and arbuscular mycorrhizal colonization. Journal of South Pacific Agriculture, 6, 29-34

Huang, Y. T., Lowe, D. J., Churchman, G. J., Schipper, L. A., Cursons, R., Zhang, H., & Cooper, A. (2016). DNA adsorption by nanocrystalline allophane spherules and nanoaggregates, and implications for carbon sequestration in Andisols. Applied Clay Science, 120, 40-50.

Jalali, M., & Jalali, M. (2016). Relation between various soil phosphorus extraction methods and sorption parameters in calcareous soils with different texture. Science of the Total Environment, 566, 1080-1093.

Jaramillo S. P.; Osorio N. W. (2009). Factores que determinan la dependencia micorrizal de las plantas. Suelos Ecuatoriales, 35 (2), 34-40.

Juo, A. S. R., & Fox, R. L. (1977). Phosphate sorption characteristics of some bench-mark soils of west Africa. Soil Science, 124 (6), 370-376.

Minten, B., Dereje, M., Engida, E., & Kuma, T. (2017). Coffee value chains on the move: Evidence in Ethiopia. Food Policy. Paper 66. https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2017.07.012. In press.

Murphy, J. A., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, *27*, 31-36.

Mundus, S., Carstensen, A., & Husted, S. (2017). Predicting phosphorus availability to spring barley (Hordeum vulgare) in agricultural soils of Scandinavia. Field Crops Research, 212, 1-10.

Osorio, N., W. (2014). Manejo de nutrientes en suelos del trópico. Colombia. 1 ed: ISBN:978-958-44-97-468 Editorial L. Vieco S.A.S. 416 pp

Osorio, N. W., & Habte, M. (2015). Effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in tropical soils with contrasting phosphate sorption capacity. Plant and Soil, 389 (1-2), 375-385.

Peña-Ramírez, V. M., Vázquez-Selem, L., & Siebe, C. (2009). Soil organic carbon stocks and forest productivity in volcanic ash soils of different age (1835–30,500 years BP) in Mexico. Geoderma, 149 (3), 224-234.

Pizzeghello, D., Berti, A., Nardi, S., & Morari, F. (2014). Phosphorus-related properties in the profiles of three Italian soils after long-term mineral and manure applications. Agriculture, ecosystems & environment, 189, 216-228.

Roy, E. D., Willig, E., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Vazquez, F. F., Pegorini, L., & Porder, S. (2017). Soil phosphorus sorption capacity after three decades of intensive fertilization in Mato Grosso, Brazil. Agriculture, Ecosystems & Environment, 249, 206-214.

Shafqat, M. N., & Pierzynski, G. M. (2014). The Freundlich adsorption isotherm constants and prediction of phosphorus bioavailability as affected by different phosphorus sources in two Kansas soils. Chemosphere, 99, 72-80.

Sadeghian K., S.; Mejia M., B.; Arcila P., J. (2006) Composición elemental de los frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha. Cenicafé 57 (4), 251-261.

Sadeghian, K. S., & González, H. (2012). Alternativas generales de fertilización para cafetales en la etapa de producción.Avances Técnicos Cenicafé, 424, 1-8.

Sadeghian, S. (2008). Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia: Guía Práctica. Boletin técnico Cenicafé 32. 43p

Sadeghian K., S.; Mejia M., B.; Arcila P., J. (2006) Composición elemental de los frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha. Cenicafé 57 (4), 251-261.

Schulze, D. G., & Dixon, J. B. (2002). An introduction to soil mineralogy. Soil mineralogy with environmental applications, SSSA book series 7. P. 1-35.

Shoji, S., & Takahashi, T. (2002). Environmental and agricultural significance of volcanic ash soils. Global Environmental Research-English Edition, 6(2), 113-135.

Wang, N., Jassogne, L., van Asten, P. J. A., Mukasa, D., Wanyama, I., Kagezi, G., & Giller, K. E. (2015). Evaluating coffee yield gaps and important biotic, abiotic, and management factors limiting coffee production in Uganda.European Journal of Agronomy, 63, 1-11.

Yan, X., Wei, Z., Hong, Q., Lu, Z., & Wu, J. (2017). Phosphorus fractions and sorption characteristics in a subtropical paddy soil as influenced by fertilizer sources. Geoderma, 295, 80-85.

Yost, R. S., Kamprath, E. J., Naderman, G. C., & Lobato, E. (1981). Residual effects of phosphorus applications on a high phosphorus adsorbing oxisol of Central Brazil. Soil Science Society of America Journal, 45 (3), 540-543.

Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of The Total Environment, 612, 522-537.

4. Capítulo 3. Aislamiento de hongos y evaluación de su capacidad para solubilizar fosfato

4.1 Resumen

El fósforo (P) es abundante en el suelo en sus formas orgánicas e inorgánicas, pero su biodisponibilidad es limitada como consecuencia de la alta fijación, especialmente en suelos derivados de cenizas volcánicas. Para el manejo de dicha problemática se propone entre otras, el uso de hongos solubilizadores de fosfatos (HSP) que, aunque muestran alentadores resultados en laboratorio, su efectividad en condiciones de campo es discutible. Con el objetivo de ahondar en el entendimiento de la dinámica de los HSP en diferentes suelos y establecer criterios de bioprospección y selección acorde con la realidad de la caficultura colombiana, se aislaron, identificaron y evaluaron algunas características de crecimiento y metabolismo de HSP asilados a partir de la rizosfera de cafetales cultivados en los suelos Typic Udivitrand (QU), Pachic Fulvundand (CH) y Typic Melanudand (TI). Se obtuvieron en total 55 aislamientos o cepas (27 de CH, 19 de TI y 8 de QU) que solubilizaron entre 16 y 106 mg L^{-1} de P a partir de la roca fosfórica. La solubilización fue explicada en función del pH del medio y de la producción y diversidad de ácidos orgánicos (AO) generados, siendo predominante el tartárico y el succínico en aquellas cepas con mayor capacidad de solubilización. La tasa de crecimiento de los HSP fue superior en aquellos que generaron menor concentración de ácidos orgánicos. La capacidad de fijación de P, así como la concentración y humificación de la materia orgánica

del suelo se asociaron con la abundancia de unidades formadoras de colonia de los HSP de cada suelo.

4.2 Introducción

En general, de la totalidad de nutrimentos esenciales que requieren las plantas, el fósforo (P) puede considerarse el de menor disponibilidad en diferentes áreas agrícolas del mundo, especialmente en andisoles cuyos atributos de naturaleza química les permite fijarlo fuertemente (Velásquez *et al.,* 2016; Shoji y Takahashi, 2002). Así, a pesar que las fracciones orgánicas e inorgánicas de P en el suelo sean abundantes (Miller y Arai, 2017), se pueden presentar limitantes en su biodisponibilidad para los cultivos (Bunemann, 2015). Tradicionalmente la aplicación de fertilizantes fosfóricos solubles se constituye en la alternativa comúnmente empleada (Roy *et al*., 2017); sin embargo, en muchos casos esta práctica es inefectiva, costosa y genera riesgos de contaminación (Tian *et al*., 2017).

El incremento creciente en la demanda de fertilizantes fosfóricos a partir de 2017 y la proyectada disminución de las reservas (IFA, 2013; Wendling *et al.,* 2013), permite prever que esta opción puede no ser sostenible en el tiempo. Además, en la industria de fertilizantes fosfóricos se emplea ácidos fuertes de síntesis química (Matta *et al*., 2017; Belboom *et al*., 2015; Al-Thyabat and Zhang, 2015) para mejorar su solubilidad, pero esto aumenta costos y genera riesgos ambientales (Cordell *et al.,* 2009).

Es bien sabido que algunos microorganismos del suelo pueden solubilizar compuestos fosfóricos y así mejorar la disponibilidad de fosfato para las plantas (Adeleke *et al.,* 2016; Jain y Singh, 2016; Khan *et al*., 2010). Entre ellos, los hongos solubilizadores de P (HSP) se consideran más efectivos que las bacterias (Whitelaw, 1999). Algunos, solubilizan el P contenido en la fracción orgánica del suelo a partir de enzimas fosfatasas (Lazo *et al*., 2017; Jain y Singh, 2016), mientras que otros disuelven fosfatos minerales a partir de la secreción de ácidos orgánicos que resultan de la respiración oxidativa o de la fermentación de compuestos carbonaceos (Wyciszkiewicz *et al*., 2016; Acevedo *et al*., 2014; Osorio y Habte, 2014; De-Oliveira *et al*., 2014; Osorno y Osorio, 2014; Haq *et al*., 2003;).

Aunque la literatura reporta experiencias de investigación sobre la efectividad de hongos y de bacterias en la disolución de P (Saravanakumar *et al.,* 2013; Xiao *et al.,* 2008; Stamford *et al.,* 2007; Dwivedi *et al*., 2004), pocas tecnologías logran trascender del laboratorio al campo (Khan *et al*., 2010), o la extrapolación de los resultados a diferentes condiciones de suelos y cultivos es discutible por el alto nivel de incertidumbre que se genera (Owen *et al.,* 2015). Parte de esto se debe a que aún se requiere profundizar en el conocimiento de las variables que explican la dinámica de los microorganismos seleccionados y las características del ambiente al que van dirigidos (Zhao y Zhang, 2015) o, por el contrario, es preciso desarrollar procedimientos simples y de baja complejidad (Rolewicz *et al.,* 2017) a través de los cuales se logre materializar una formulación adecuada para su uso en sistemas suelo-planta. En algunos casos se sugiere utilizar microorganismos nativos de la zona de estudio y que ya estén asociados a las plantas cultivadas de interés y adaptados a las condiciones del suelo (de La Luz Mora *et al*., 2017; Mahecha *et al.* 2017).

Adicionalmente, es preciso determinar las características del suelo que condicionan la presencia de HSP efectivos y las variables a través de las cuales dicho fenómeno pueda llegar a predecirse. La hipótesis de investigación fue que la abundancia relativa de HSP efectivos en andisoles para disolver roca fosfórica (RP), es mayor en aquellos con mayor capacidad de fijación de P, entre otros factores. Esto se considera como un primer paso para entender la dinámica de solubilización de los HSP en diferentes suelos y establecer criterios de bioprospección y selección acorde con los recursos disponibles y a la realidad de la caficultura en Colombia.

Por lo mencionado, el objetivo de este estudio fue aislar, identificar, evaluar bajo condiciones *in vitro* y seleccionar HSP a partir de la rizosfera de cafetales cultivados en andisoles con diferente capacidad de fijación del elemento, y establecer la relación que esta característica ejerce en la abundancia relativa de estos microorganismos.

4.3 Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en el laboratorio de microbiología de suelos del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), ubicado en Chinchiná, vereda Plan Alto, coordenadas 5°15´34" N, 75°15´34"W a una altitud de 1430 m.

Se seleccionaron tres lotes sembrados con café durante al menos 20 años. Los sitios correspondían a tres suelos clasificados como Andisoles con diferente capacidad para fijación de P (Quindío, Chinchiná y Timbío) seleccionados a partir de los resultados del capítulo 2. Algunas propiedades de los suelos, entre ellas contenido de materia orgánica (MO) y su nivel de humificación (IM) se pueden observar en la Tabla 4-1. Para tal propósito, las muestras se colectaron de la zona de raíces, alrededor de 500 g de suelo rizosférico de diferentes árboles, en los primeros 30 cm de profundidad.

Tabla 4-1. Clasificación de los suelos seleccionados con relación a la cantidad de P que es necesario aplicar, para alcanzar el nivel de $P_{0.2}$ en la solución del suelo.

Suelo	Taxonomía	Ubicación		IM*	pH	MO	Valor $P_{0.2}$	Categoría***
	(USDA)	Departamento	Municipio/ Vereda			(%)	(mg kg^{-1})**	
Quindío (QU)	Typic Udivitrand	Quindío	Buenavista/ Río Verde	1.8	5.2	6	374	Media
Chinchiná (CH)	Pachic Fulvudand	Caldas	Chinchiná/ La quiebra	1.9	4.6	12	619	Alta
Timbío (Ti)	Typic Melanudand	Cauca	Timbío/San Joaquín	1.6	5.2	18	615	Alta

*Índice melánico: Determinado a través de la relación de absorbancia 450 nm/520 nm

**Valor $P_{0.2}$= Cantidad requerida para obtener en solución 0.2 mg L^{-1} de solución de suelo
** Categoría según Juo y Fox (1977).

Los lotes presentaban un historial de manejo acorde con las recomendaciones de Cenicafé, en lo que tiene que ver con el control de arvenses (no uso de herbicidas al suelo), fertilizaciones basadas en análisis del suelo y prácticas de conservación del suelo (FNC, 2013).

4.3.1 Aislamiento

De cada una de las muestras de suelos seleccionados, se tomaron 10 g en (base seca), se disolvieron en 90 mL de una solución de NaCl (0.85%) estéril y se agitaron por 3 h a 120 r.p.m. Esta dilución incial constituyó la dilución 10^{-1}, lo cual se repitió sucesivamente hasta obtener la dilución serial 10^{-6}. Luego, 0.1 mL de cada dilución se transfirió asépticamente a cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA + cloramfenicol (0.15%) como agente antibacterial. Las cajas se incubaron por siete días a 28°C y las colonias de hongos que allí crecieron se sembraron en el medio de Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) modificado, el cual contenía Cloramfenicol (1.5 g L^{-1}), púrpura de bromocresol (0.05%), glucosa (1.0%) como fuente de carbono (C) y roca fosfórica (RP) del Huila (3.5 g L^{-1}) como única fuente de P. La composición qupimica elemental de RP según la etiqueta del fabricante es (en %): 33.7 ± 2.7 P_2O_5, 45.5 ± 2.96 CaO, 10.96 ± 0.81 SiO_2, 2.11 ± 1.29 F, 0.54 ± 0.21 Al_2O_3, 0.45 ± 0.08 Fe_2O_3, 0.11 ± 0.03 MgO y 0.31 ± 0.20 SO_4.

Las cajas Petri con su respectivo hongo se incubaron a 28°C durante 10 días.

Identificación de colonias de hongos con capacidad de solubilización de P

Los hongos (tratamiento) que a partir el procedimiento anterior exhibieran un halo de color violeta alrededor de su colonia, se trasfirieron a una concentración de 10^7 esporas por mL a enlermeyer de 250 mL de capacidad (unidad experimental) que contenían 50 mL del medio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) modificado en estado líquido. Este medio estaba constituido por los mismos componentes descritos anteriormente, excepto Agar. Como referencia se incluyó un testigo absoluto no inoculado (control) y un tratamiento con el hongo *Paecilomyces lilacinus*, que la literatura reporta como HSP (Arrieta *et al.*, 2015), el cual fue cedido por la compañía Soluciones Microbianas del Trópico (www.smdeltropico.com).

Luego de siete días de incubación a 28ºC, las unidades experimentales se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 15 minutos y filtró a través de un papel del filtro Whatman 42. Alícuotas del filtrado se tomaron con el fin de determinar la concentración de P en solución (mg L^{-1}) a través del método del fosfomolibdato descrito en el capítulo 2 empleando una longitud de onda de 420 nm y el pH final del medio (variables de respuesta) a través un

potenciométrico (Mettler Toledo). Con las variables de respuesta, se estimó para cada HSP el promedio y variación y se realizó el análisis de varianza bajo el modelo completamente aleatorio. Para identificar aquellos HSP que difieren del testigo relativo, se utilzó la prueba de Dunnett al 5%.

4.3.2 Determinación de Ácidos orgánicos (AO)

En el laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, se determinó la concentración de ácidos orgánicos málico, oxálico, tartárico, cítrico, succínico y láctico en el medio líquido correspondiente a cada muestra según el método de Aung y Ting (2005). Para tal fin se seleccionaron nueve cepas que generaron concentración final de P en solución en cuatro categorías correspondientes (baja: < 40, media: 40-60, alta: 60-90 y muy alta: >90 mg L^{-1}). El procedimiento consistió en medir dichos ácidos (un análisis por cada HSP seleccionado) en el medio líquido en el que crecieron los HSP. Dicho medio se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min, y se filtró través de una membrana 0.22 µm para luego ser inyectado en el equipo de HPLC Agilent serie 1100 acoplado a un detector UV/VIS. La fase móvil empleada fue una solución de ácido orto- fosfórico al 0.05% empleando una columna SUPELCOGEL H (78 x 300 mm). En todos los casos se obtuvieron curvas de calibración presneron un coeficiente de determinación (r^2) superior a 0.99.

Evaluación del crecimiento de HSP

En cuatro HSP caracterizados por su efectividad para solubilizar P (> 40 mg L^{-1}) y que exhibieran contrastes en la concentración y tipo de AO generados según la prueba descrita en el numeral anterior, se hizo el seguimiento al crecimiento de sus colonias. Para tal fin, en cajas Petri que contenían PDA + ácido láctico (0.1%) como agente bactericida, se transfirió una alícuota de 10 µL (concentración $1x10^7$ esporas /mL) por cada HSP, procurando ubicar dicha suspensión en el centro de la caja respectiva. Luego de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 15 días del procedimiento, se midió el diámetro de las colonias de los HSP (variable de interés) que allí crecieron. Se tuvieron 12 unidades de observación (cajas) para cada HSP obteniendose el promedio y variación del diámetro de las colonias.

4.3.3 Determinación de la especie de los HSP

Los cuatro HSP seleccionados para la prueba de crecimiento se determinaron a para género y especie mediante secuenciación de regiones intergénicas transcritas 1 y 2 del ADN ribomosomal (ITS). De esta forma, cada colonia de los HSP objeto de estudio, se transfirió a 5 mL de caldo papa dextrosa broth (PDB) el cual se incubó entre 28 - 30°C en agitación a 150 rpm hasta fase logarítmica. Posteriormente para la recuperación de la biomasa, se centrifugó el cultivo en medio líquido durante 10 minutos a 2500 rpm; el sedimento resultante se lavó dos veces con solución salina estéril al 0,85%, centrifugando cada vez para limpiar el micelio. Luego de esto, 100 mg de tejido se usaron para la extracción ADN a través del Kit DNeasy Plant Mini Kit® Genomic DNA (Qiagen®, EUA), empleando el protocolo recomendado para hongos.

La eficiencia del proceso de extracción de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, usando como marcador de peso molecular el fago λ/Hind III. Para la cuantificación y estimación de la calidad, se usó el Nanodrop 2000c verificando una relación 260/280 nm que estuviese entre 1.8 y 2.0 y 260/230 nm entre 1.8 y 2.2.

Se realizó la amplificación de la región intergénica ITS1 y 2 y la subunidad ribosomal 5.8 S de los aislamientos a partir del ADN genómico. Para esto se utilizaron los iniciadores o primers universales ITS5 e ITS2, 5´(GGAAGTAAAAGTCCTAACAAG)3´ e ITS4 5´(TCCTCCGCTTATTGATATGC)3´, con el fin de amplificar un fragmento de aproximadamente 600 pb. Se usó un volumen final de 25 µL por reacción de PCR (buffer de PCR 1X, dNTPs 0.2 mM, $MgCl_2$ 1mM, primers 0.5 µM, taqADN polimerasa recombinante (Invitrogen®) 1U y 100 ng de ADN bacteriano). Se utilizó el termociclador PTC-100 (Bio- Rad®, EUA) y el siguiente programa de amplificación de PCR: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, 1 minuto de desnaturalización adicional a 92°C, 35 ciclos de 72 °C por 2 minutos cada uno. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Se realizó la secuenciación de los productos de PCR en la compañía Macrogen® (Corea del Sur); para lo que se enviaron viales que contenían aproximadamente 100 ng μL^{-1} de los productos de cada

reacción de PCR.

A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis de calidad usando el programa CLC® Main Workbench (Qiagen Company, EUA), empleando como criterios de aceptación un valor Phred mayor a 30 por base y como criterio de rechazo una ventana con 50 bases inferior al valor Phred, y un tamaño inferior a 500 bases.

Por último, se desarrolló la anotación de las secuencias usando el programa BLASTN ver. 2.2.27+ (Altschul *et al.,* 1990) contra la base de datos nt del NCBI, con un valor-e de 1×10^{-5}. Estos resultados se filtraron con el 80% de similitud y 80% de cobertura de la región que se estaba amplificando con los primers descritos en el numeral anterior.

4.3.4 Recuento de hongos totales y de HSP

Con el propósito de corroborar la hipótesis de investigación “la abundancia relativa de HSP efectivos en andisoles para disolver roca fosfórica (RP), es mayor en aquellos con mayor capacidad de fijación de P, entre otros factores”, se llevó a cabo un recuento del número de colonias de hongos, solubilizadores y no solubilizadores de P por cada suelo objeto de estudio. El procedimiento consistió en tomar 12 cajas de Petri por cada suelo y a cada una transferirle 0.1 mL de la dilución 10^{-4}. Las cajas contenían el medio Pikovskaya modificado descrito anteriormente. Luego de cinco días de incubación, se cuantificaron el total de cepas que allí crecieron, distinguiendo aquellas que exhibieran cambios en el color del medio alrededor de la colonia (HSP) de aquellas que no presentaban dicha característica (otros hongos).

4.3.5 Análisis de la información

Prueba de solubilización

Para cada cepa de HSP se obtuvo el promedio de P y de pH en solución y se estimó su respectivo error estándar. A través de una prueba de separación de medias Dunnett con

un nivel de significancia ($P \leq 0.05$) se identificaron poblaciones de HSP con promedios de solubilización y de pH mayores o inferiores al hongo de referencia (*Paecilomyces lilacinus*). Adicionalmente, a través de un análisis de correlación de Pearson ($P \leq 0.05$) se evaluó la relación entre el P solubilizado y el pH de la solución.

Evaluación de crecimiento para los HSP

A partir del análisis descriptivo de los datos se estimó el promedio diario de crecimiento para cada HSP seleccionado y se calcularon los intervalos de confianza al 5%.

Recuento de hongos totales y de HSP

A partir del número de hongos totales y de HSP que crecieron en el medio específico para solubilizadores de P, se obtuvo el número de unidades formadoras de colonia (UFC/g suelo) y se estableció la proporción de HSP. Posteriormente, a partir de una prueba Duncan al 5% se establecieron las diferencias para cada suelo.

Todas y cada uno de los análisis y pruebas estadísticas descritas se llevaron a cabo en el paquete estadístico SAS versión 9.4 © (2016 by SAS Institute Inc. Cary NC, USA).

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Identificación de colonias de hongos con capacidad de solubilización de P

Se obtuvieron un total de 55 aislamientos o cepas de hongos con capacidad para solubilizar RP (Figura 4-1): 27 de Chinchiná (CH), 19 de Timbío (TI) y 8 de Quindío (QU). En los aislamientos se obtuvo una concentración final promedio de P en solución que fluctuó entre 16 y 107 mg L^{-1}. El testigo o control no inoculado presentó un valor medio de 3,9 mg L^{-1}, mientras que, en el hongo de referencia, *P. lilacinus,* el valor medio fue de 38.2 mg L^{-1}. El 58% de los aislamientos mostraron niveles de solubilización significativamente superiores al hongo de referencia.

Estudios de solubilización de P en laboratorio muestran resultados diferenciales en la solubilización de P de acuerdo al HSP o la fuente mineral a la que se sometan dichos organismos. En este sentido, fuentes fosfóricas de menor solubilidad a la utilizada en el presente estudio (RP) presentan que *Aspergillus niger* solubiliza más de 2.540 mg L^{-1} de P a partir de fosfatos de Ca (Acevedo *et al*., 2014). Del mismo modo Zhao y Zhang (2017), trabajando con fosfato tricálcico y fosfato dibásico de Ca, hallaron que *Trichoderma asperellum*, solubilizaba alrededor de 160 mg L^{-1}. Mittal *et al.* (2008), registran valores de solubilización de P de 760 y 148 mg L^{-1} inoculando fosfato tricálioco y RP respectivamente, con los HSP *Aspergillus awamori* y *Penicillium citrinum*. Finalmente, Osorno y Osorio (2014) registran entre 80 y 120 mg L^{-1} de P solubilizado a partir de la RP inoculada con *Aspergillus niger* y *Mortierella* sp.

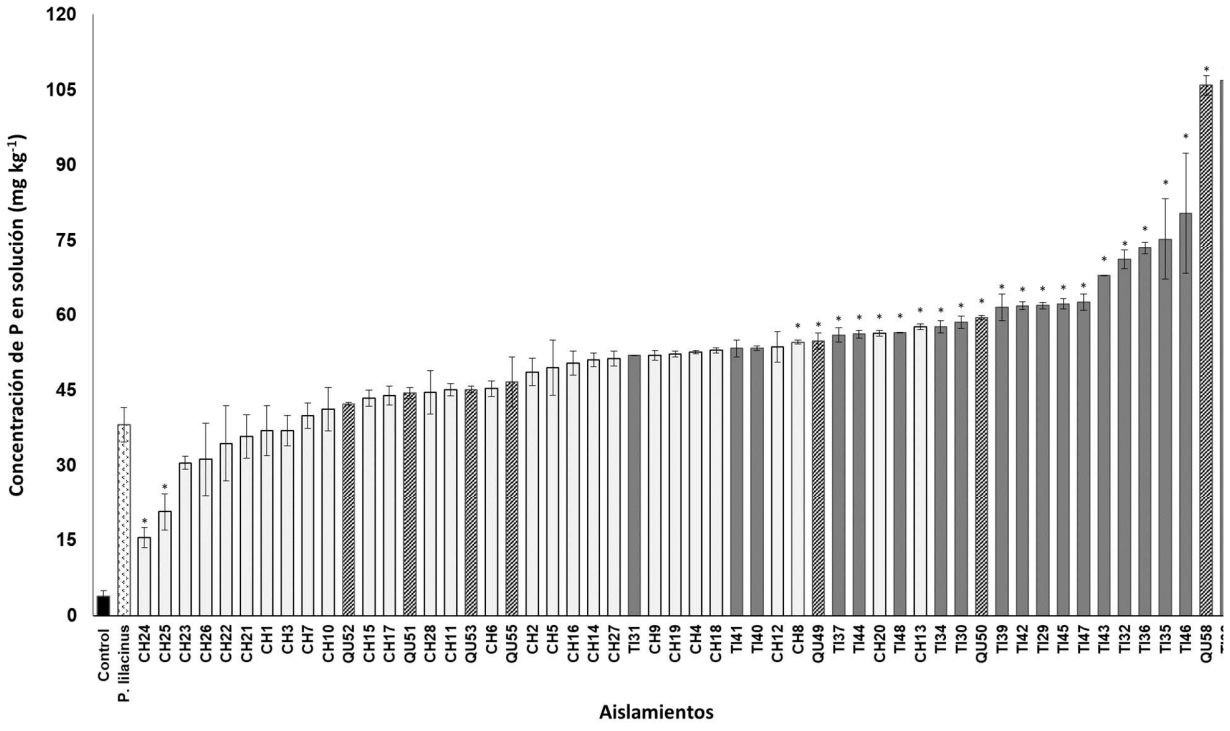


Figura 4-1. Concentración final de P en solución (mg L^{-1}) en función de la inoculación con cepas de HSP aislados de cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia (CH: Chinchiná, QU: Quindio y TI: Timbio). Se incluyó como referencia un tratamiento no inoculado (Control) y un

hongo de referencia (*P. lilacinus*). Las barras indican error estándar. Asterisco indica promedios diferentes del *P. lilacinus* según prueba Dunnett (P<0.0001).

De acuerdo con lo anterior, las diferencias en los resultados obtenidos con respecto a los reportados en la literatura aparte de estar asociadas con la fuente mineral de P, pueden explicarse en función del tipo de microorganismo objeto de estudio, de los componentes del medio de cultivo utilizado y del tiempo de incubación empleado para el proceso de solubilización, principalmente.

Con relación al pH de la solución, en el control este fue de 6,4 y estuvo entre 3,0 y 4,2 para los demás aislamientos incluyendo el *P. lilacinus*. (Figura 4-2). Sólo cuatro cepas mostraron niveles de pH superiores estadísticamente al *P. lilacinus* (CH21, CH3, CH7 y TI43), al tiempo de exhibir alta efectividad para la disolución de P desde la RP.

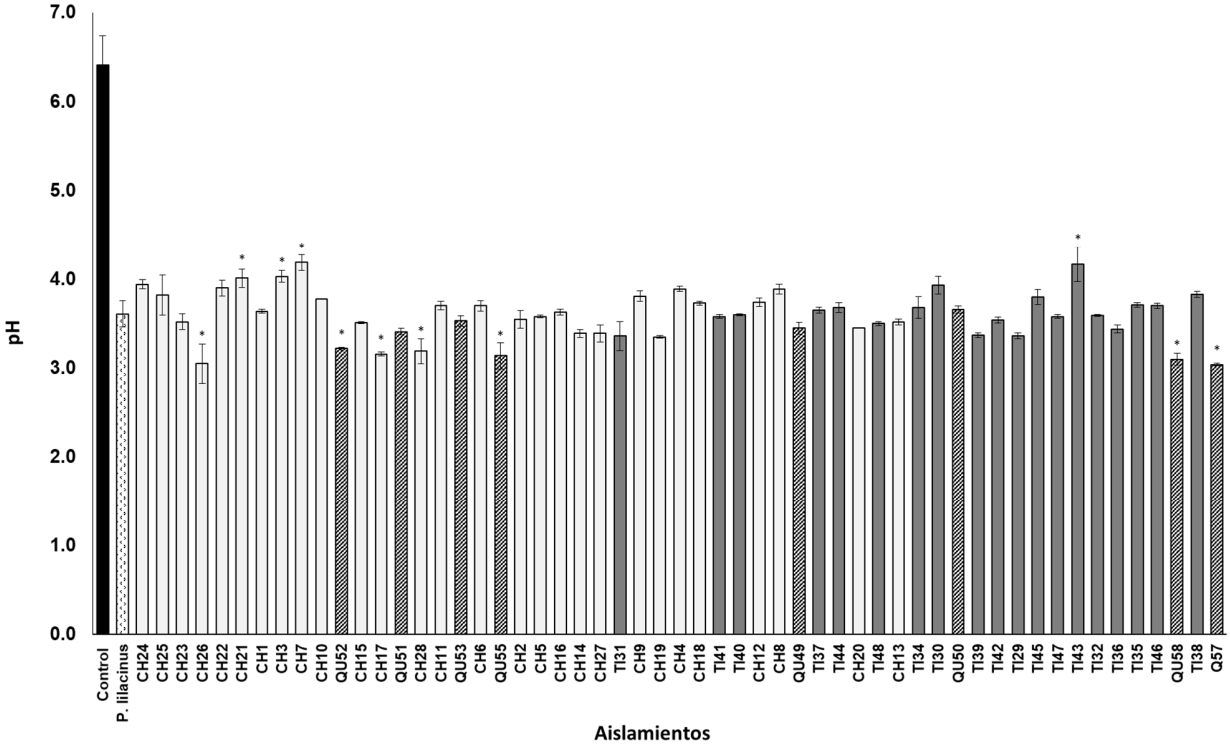


Figura 4-2. pH de la solución final en función de la inoculación con cepas de HSP aislados de cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia (CH: Chinchiná, QU: Quindio y TI: Timbio). Se incluyó como referencia un tratamiento no inoculado (Control) y un hongo de referencia (*P. lilacinus*.). Las barras indican error estándar. Asterisco indica promedios diferentes del *P. lilacinus*. según prueba Dunnett (P<0.0001).

Uno de los principales mecanismos involucrados en la solubilización del P presente en minerales poco solubles se relaciona con la disminución del pH acidez (Saravanakumar *et al.,* 2013), reacción que se presenta químicamente viable de acuerdo con la ecuación 1 y que tiene como principio, el aporte de H^+ secretados por efecto de los procesos metabólicos que llevan a cabo los HSP durante su crecimiento y desarrollo (Khan *et al.,* 2010).

$$Ca_5(PO_4)_3OH + \mathbf{7H^+} \longrightarrow 5Ca^{2+} + 3H_2PO_4^- + H_2O \qquad \text{(ecuación 1)}$$

Energía libre -82kJ.mol^{-1}

K= $10^{14,5}$

Los resultados del estudio muestran para el caso de la RP no inoculada (testigo), que el pH fue 6.2 y la acción de los HSP logró que este disminuyera por debajo de 4.2 (Figura 4-2). Esto en principio permite validar la teoría que asocia la reducción en el pH como un fenómeno determinante en la solubilización del P desde la RP. Sin embargo, la relación entre estas dos variables (P en solución vs pH) no fue del todo consistente (Figura 4-3).

Esto quiere decir que mientras las cepas catalogadas dentro del grupo de mayor efectividad (TI38, Q57 y Q58) presentaron valores de pH entre 3.0 y 3.8; algunos HSP como el CH28 que mostraron pH de 3.19 en promedio, produjeron solamente 45 mg L^{-1} de P en solución.

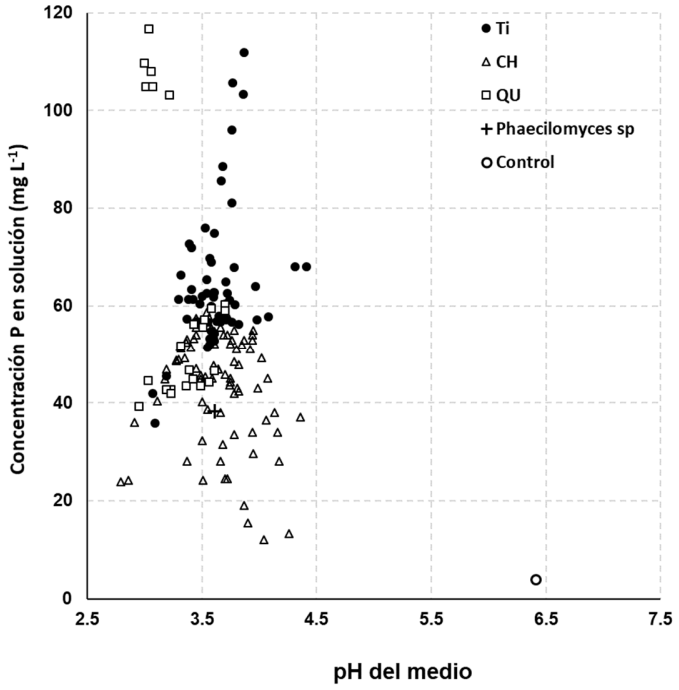


Figura 4-3. Concentración de P en solución en función del pH final obtenido 10 días después del crecimiento de hongos en el medio específico para HSP. Los hongos corresponden a cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia (CH: Chinchina, Ti: Timbío, QU: Quindío,).

Lo anterior demuestra que la acidez contribuye con la disolución de la RP, pero no es el único factor que condiciona el proceso, pues dicho comportamiento puede variar dependiendo de la fuente fosfórica como lo presentan Wyciszkiewicz *et al.* (2016).

Consideración importante para tenerse en cuenta durante las etapas de selección de HSP con potencial para solubilizar el elemento a partir de minerales fosfóricos de baja solubilidad. Por lo anteriormente mencionado, se procedió a evaluar la producción de ácidos orgánicos en cepas de hongos seleccionadas, tal como se indica a continuación:

4.4.2 Determinación de Ácidos orgánicos (AO)

Las nueve cepas seleccionadas correspondieron a las siguientes categorías de acuerdo al poder de solubilización de P:

1. Baja (< 40 mg L^{-1}): CH23, CH24.
2. Media (40-60 mg L^{-1}): CH4, CH15, CH20.
3. Alta (60-90 mg L^{-1}): TI32, TI43.
4. Muy alta (> 90 mg L^{-1}): Q57, TI38.

El análisis de AO llevado a cabo en las nueve cepas de HSP seleccionadas permitió observar las siguientes tendencias: No se detectaron ácidos málico y oxálico, pero los ácidos tartárico y cítrico fueron generados por cuatro de los nueve individuos, mientras que el succínico en dos de ellos. Se destaca el ácido láctico como el de mayor frecuencia, dado que se manifestó en el 66% de los casos (Figura 4-4).

En general, los HSP catalogados de menor poder de solubilización y sólo uno correspondiente a la categoría media (CH4), generaron el ácido láctico mocarboxílico en niveles entre 13 y 42 mg L^{-1}. Las cepas CH15 y CH20 catalogadas como intermedias, tuvieron diferente tipo y concentración de AO respecto a las del primer grupo clasificatorio. La primera de ellas generó los ácidos dicarboxílicos tartárico y succínico en niveles de 74 y 23 mg L^{-1} respectivamente; en tanto que con el CH20 fue evidente el ácido cítrico tricarboxílico (85 mg L^{-1}) y el láctico (70 mg L^{-1}). La sumatoria de las concentraciones de ácidos para estos HSP fueron 97.3 y 155 mg L^{-1}.

Los HSP clasificados en la categoría de solubilización alta, generaron ácidos cítrico y tartárico en niveles entre 12 y 92 mg L^{-1}.

Finalmente, aquellos HSP caracterizados por solubilizar la mayor capacidad de P a partir de la RP, tuvieron en común una generación de mayor diversidad y concentración de AO, siendo predominante el tartárico seguido por el succínico como los de mayor concentración.

Lo discutido anteriormente, la efectividad que tengan los HSP para disolver P a partir de la RP, depende, por lo menos en los casos extremos de alta y baja efectividad, tanto la diversidad como la concentración de AO que puedan generar durante su crecimiento.

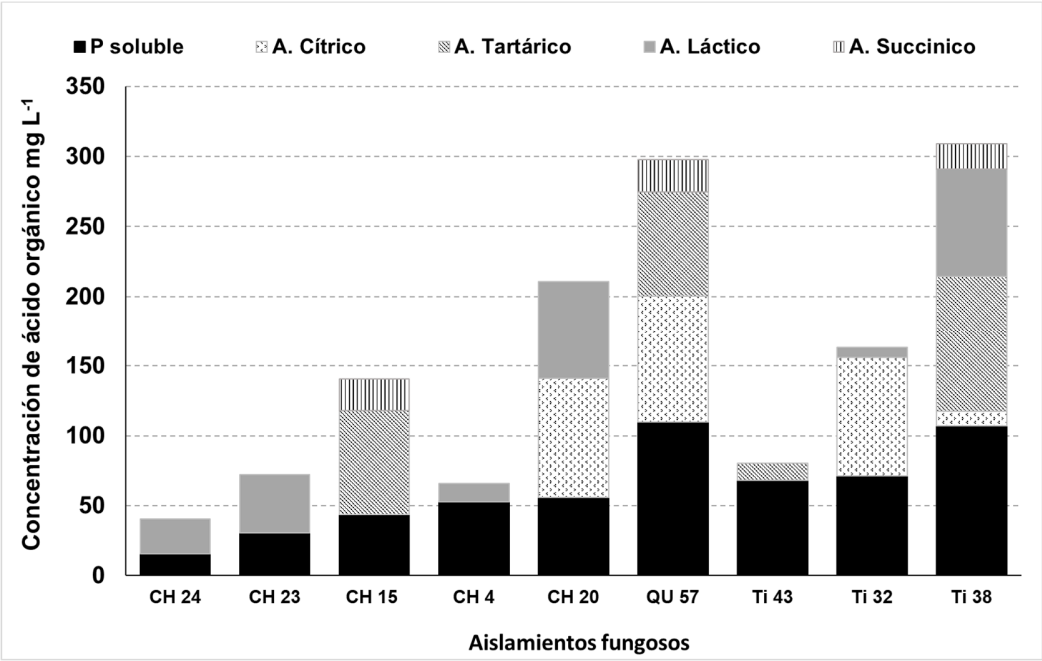


Figura 4-4. Identificación por HPLC de tipos y concentración de AO producidos por los nueve aislamientos constrastantes de HSP seleccionados a partir de cuatro suelos de la zona central cafetera de Colombia (CH: Chinchiná, QU: Quindío y Ti: Timbío).

La producción de AO depende del microorganismo por ejemplo, bacterias del género *Bacillus* spp. han sido destacadas por generar ácidos tipo láctico, glucónico, propiónico (Wyciszkiewicz *et al.,* 2016), isovalérico, isobutírico y láctico (Calvaruso *et al*., 2006), las del género *Brevibacillus* caracterizadas en producir los ácidos glucónico, cítrico (Yadav *et al*., 2013), así como fórmico, entre otros ácidos ya mencionados, se detectaron durante el proceso de disolución de RP inoculados con *Serratia* sp. (Behera *et al.,* 2017).

Al igual que para las bacterias, para el caso de los hongos, ácido cítrico ha sido ampliamente reportado para *A. niger* (Haq *et al.,* 2003; Bojinova *et al.,* 2008), ácido oxálico en *Mortierella* sp. (Osorio y Habte, 2015) y ácido glucónico derivado del metabolismo de *Eupenicillium ludwigii* (De Oliveira *et al.,* 2014), como los más sobresalientes. Dicho fenómeno es altamente dependiente de las características del mineral fosfórico en el que se desarrollan. Por ejemplo, hongos del género *Aspergillus* spp. secretan altas concentraciones de ácido cítrico cuando crecen en medio con fosfatos de Fe y de Al, pero deprimen dicha producción en presencia de RP. Del mismo modo, géneros de *Penicillum* spp. producen altas concentraciones de ácido glucónico en fuentes fosfóricas ricas en Ca, y niveles significativamente bajos, casi nulos, de ácido cítrico (De Oliveira *et al.,* 2014). En un estudio llevado a cabo con HSP aislados de plantaciones de palma en Colombia, se reporta un predominio en la producción de ácido glucónico y ácido cítrico por parte *Aspergillus niger*, creciendo en un medio con fosfatos de Ca (Acevedo *et al.,* 2014).

Por lo presentado anteriormente, el análisis de los AO secretados por los HSP puede constituir una vía adicional al pH para explicar los mecanismos de solubilización de P, dada su capacidad de generar acidez en el medio, al tiempo que actúa complejando el catión acompañante del P presente en la fuente mineral (Lazo *et al.*, 2017; Lin *et al.,* 2017). Dado que la composición química elemental de la RP está constituida por fosfatos de Ca, lo cual, de acuerdo con las reacciones químicas resultantes, tiende a generar fosfatos potencialmente aprovechables (ecuaciones 2 y 3) de acuerdo con Osorio (2011).

$$Ca_5(PO_4)_3OH + 7H^+ + 5\ \text{citrato} \longrightarrow 5\ \text{citrato de}\ Ca^{2+} + 3H_2PO_4^- + H_2O$$ (ecuación 2)

Energía libre -216kJ.mol^{-1}

K= $10^{37,9}$

$$Ca_5(PO_4)_3OH + 7H^+ + 5\ \text{oxalato} \longrightarrow 5\ \text{oxalato de}\ Ca^{2+} + 3H_2PO_4^- + H_2O$$ (ecuación 3)

Energía libre -181kJ.mol^{-1}

K= $10^{31,7}$

Con base en los índices de energía libre y el valor K de las ecuaciones presentadas, puede decirse entonces que la RP en presencia de una fuente de acidez, combinada con el AO, genera un potencial de disolución significativamente superior al que se presenta en el escenario donde la RP es sometida a tratamiento ácido, el cual habitualmente se considera como única alternativa para hacer soluble el P que contiene.

4.4.3 Evaluación del crecimiento de HSP

Para determinar las posibles implicaciones en el desarrollo de los HSP efecto de la generación de AO, se hizo una evaluación de crecimiento a cuatro cepas de HSP (CH20, CH4, QU57, Ti38), que exhibieran contrastes en la producción de AO en términos de cantidad y diversidad (Figura 4-5).

En general, la cepa CH4, la cual presentó el mayor crecimiento de colonia (7.7 cm), sólo produjo ácido láctico (monocarboxílico) (Figura 4-5). En contraste, la cepa TI38 que se caracterizó por ser la más efectiva en solubilizar P y que produjo la mayor concentración y diversidad de ácidos detectados en el análisis (cítrico, tartárico, láctico y succínico), exhibió al final del período de evaluación 2,2 veces menos desarrollo respecto al CH4. Finalmente, para los HSP Q57 y CH20 cuyo crecimiento de colonias fue intermedio y produjeron entre dos a tres tipos de AO.

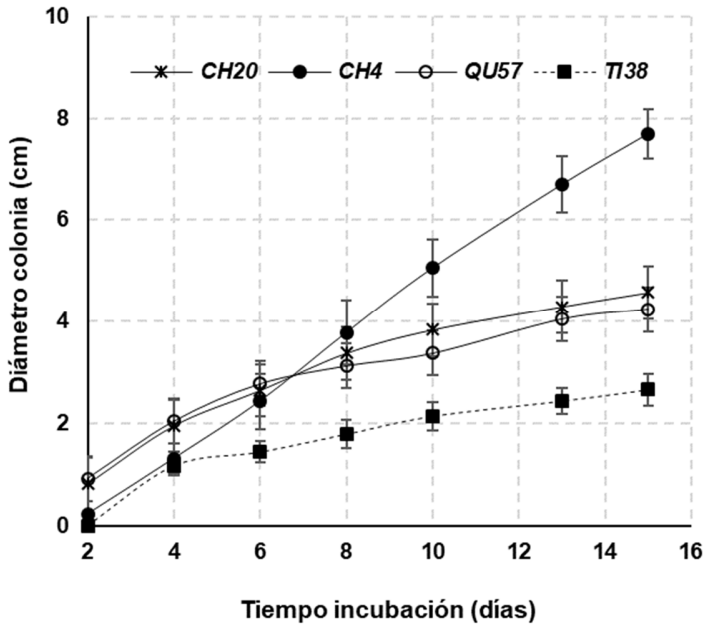


Figura 4-5. Diámetro de colonias fungosas en función del tiempo de incubación luego de inocular el medio con cinco aislamientos de HSP obtenidos de cuatro suelos de la zona cafetera central de Colombia. Barras verticales indican intervalos de confianza al 5 %.

Lo encontrado estaría indicando particularmente para los HSP de mayor capacidad de solubilización de P que su efectividad puede representar un costo energético significativo debido a que durante el ciclo de Krebs (Sylvia *et al.,* 1999), la secreción de este tipo de sustancias ocasiona un “drenaje de carbono”, el cual puede ser evidente en la pérdida de biomasa (Deng *et al.,* 2016) y, por consiguiente, constituyen una barrera para el crecimiento de los HSP.

De acuerdo con los resultados, las pruebas de solubilización de P asociadas a los valores del pH de la solución, así como la concentración y diversidad de los AO secretados durante el proceso, pueden constituir un indicador del potencial de solubilización de P. Pese a esto, es necesario considerar en este tipo de pruebas, variaciones en los contenidos de elementos y sustancias orgánicas disponibles en el suelo al que esta biotecnología va dirigida; pues como se ha indicado, la solubilización de P por parte de los HSP puede ser el resultado de las condiciones de *stress* por carencia o abundancia de recursos esenciales que en determinado momento pueden presentarse en el ambiente al que estén expuestos.

Sobre lo anterior, la modificación parcial de los niveles de K, Mg (Kumar y Rai, 2017), N y la fuente de C en el medio de cultivo (Osorno y Osorio, 2014), determinan significativamente el poder y la efectividad de solubilización de P por los microorganismos asilados y seleccionados para tal fin.

4.4.4 Determinación de género y especie mediante secuenciación de ITS 1 y 2 del ADN ribosomal de los HSP seleccionados

Tres aislamientos presentaron similitud (>99%) con el género *Penicillium*, en tanto que CH4 se identificó como *Phlebia* (Tabla 4-2).

Hongos del género *Penicillium,* que constituye uno de los géneros más abundantes en diversos hábitats del planeta (Visagie *et al.,* 2014; Coutinho *et al*., 2012), han sido a registrados por su habilidad para solubilizar minerales fosfóricos catalogados como solubles (Jain *et al.,* 2014), hasta materiales de muy baja solubilidad tales como fosfatos de Ca, fosfatos de Fe y fosfatos de Al en condiciones de laboratorio. Para los fosfatos de menor solubilidad, dicho efecto se atribuye a la producción de ácidos cítrico y gluónico (Efthymiou *et al*., 2018). De Oliveira *et al.* (2014), asilaron cepas del género en cuestión a partir de cultivos de Eucalipto y demostraron la bondad que presentaban para solubilizar P a partir de fosfatos de Ca, Fe y Al; así como RP de diferente origen; encontrando que dicho efecto era gobernado por la secreción de los ácidos cítrico, glucónico y oxálico. Dichos efectos han trascendido del laboratorio al campo, favoreciendo la absorción de P en plantas de maíz y trigo Singh y Reddy (2011).

Tabla 4-2. Identificación más probable de los cuatro HSP seleccionados para el estudio.

HSP	Secuencia (pb)	Identificador Genbank	Alineamiento (pb)	Identidad %	Género	Especie
CH4	651	KJ831936.1	612	99	*Phlebia*	cf. *subserialis*
CH20	552	GU934553.1	556	99	*Penicillium*	cf. *jantinellum*
Q57	536	KX953360.1	535	100	*Penicillium*	sp.
TI38	538	NR_121514.1	541	99	*Penicillium*	*ubiquetum*

Específicamente en el género *Phlebia*, se reconoce su papel en la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes (Xiao *et al*., 2011), generación de etanol (Tsuyama *et al*., 2017) y transformación de materiales con potencial uso en la agricultura como el estiércol de pollos (Zhao *et al.,* 2017), más no se reporta su efectividad para disolver RP.

4.4.5 Asociación entre la abundancia de HSP y la capacidad de fijación del suelo

Con el objetivo de evaluar la hipótesis de investigación propuesta "la abundancia relativa de HSP efectivos en andisoles para disolver roca fosfórica (RP), es mayor en aquellos con mayor capacidad de fijación de P, entre otros factores", se realizó un recuento de hongos totales y HSP en los suelos objeto de estudio.

El procedimiento permitió establecer que el número de UFC fue diferente tratándose de un suelo u otro. El suelo que presentó mayor número de UFC totales, es decir con y sin capacidad de solubilización de P fue QU con un promedio de 50 UFC/ g^{-1} suelo seguido por CH y TI cuyos valores promedios fueron 18 y 3 UFC respectivamente (Figura 4-6).

Del total de UFC registradas para el medio de solubilización específico objeto de estudio, en CH el 100% de los asilamientos correspondieron a HSP mientras que para TI y QU correspondió al 35 y 5% respectivamente (Figura 4-7).

Lo anterior, estaría indicando que la capacidad de fijación de P que presenta el suelo es un factor que condiciona en buena medida la abundancia de HSP pues el nivel de P requerido para alcanzar $P_{0.2}$ fue en su respectivo orden CH ≥ Ti > QU (Tabla 4-1). Sin embargo, la similitud entre el poder de fijación de P en los suelos CH y Ti, permite establecer que la materia orgánica (MO) podría constituirse en otra variable de peso para explicar el fenómeno. De esta manera, la presencia de sustancias carbonáceas lábiles que constituyen materia prima para garantizar eficientemente procesos metabólicos que favorecen la disolución de P por los HSP (Gaind, 2016) pueden ser las responsables del fenómeno que se viene discutiendo, dado que los HSP son organismos heterótrofos (Sylvia *et al*., 1999).

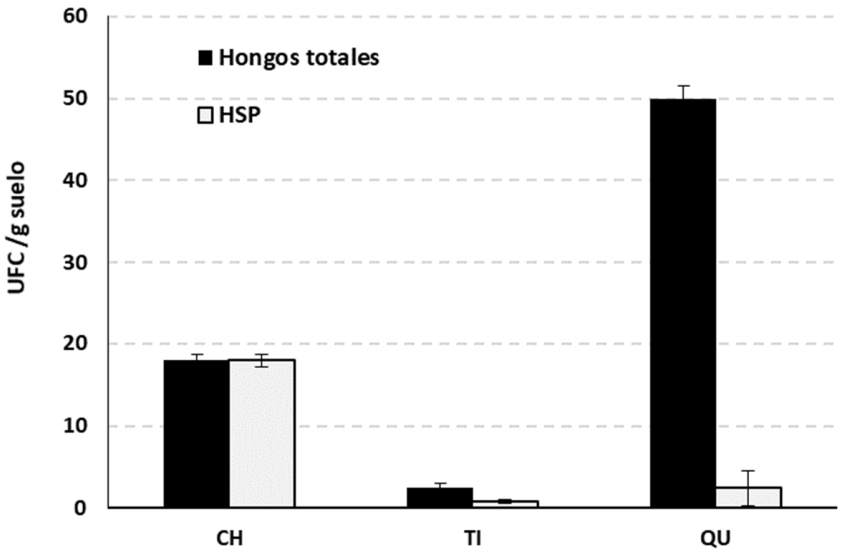


Figura 4-6. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos totales y de HSP en los suelos objeto de estudio. Barras verticales indican error estándar.

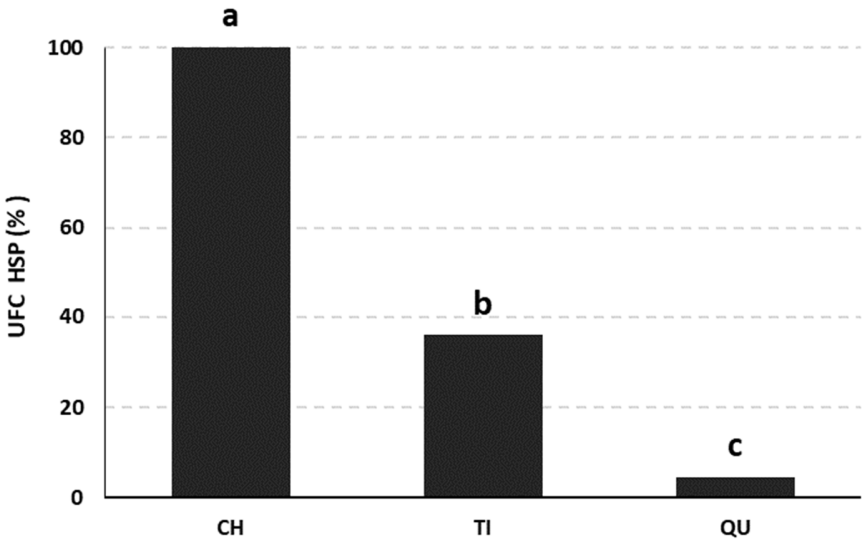


Figura 4-7. Abundancia relativa de HSP en los suelos objeto de estudio. Letras no comunes indican diferencia estadística de acuerdo con prueba Duncan ($P < 0.0001$)

Bajo este esquema, los compuestos orgánicos que sirven como fuente de C y de energía para los HSP pueden estar limitados en TI donde el contenido de MO (18%) es notablemente superior al de CH (12%). Es decir, una alta acumulación de MO puede corresponder a una baja tasa de mineralización, como consecuencia de sustancias tipo humus que corresponde a la fracción estable y por consiguiente, habrá menor cantidad de fuentes de C fácilmente utilizables por los microorganismos (Berg, 2017). Evidencia de lo anterior, es que la taxonomía de los andisoles admite que un suelo clasificado dentro de los Fulvudands, grupo al que pertenece CH, la MO es menos humificada que en los Melanudands (Shoji *et al.,* 1994), categoría a la que corresponde al suelo de TI. Fenómeno que puede justificarse además con base en los resultados del índice melánico determinado para cada caso (Tabla 4-1), el cual guardó el siguiente orden: CH (1.9)> QU (1.8) >TI (1.6) y que disminuye su valor conforme la MO presenta un mayor grado de humificación (Shoji *et al*., 1994).

Para el suelo de QU, que se caracteriza por la baja fijación de P, los bajos niveles de MO como consecuencia de una mayor tasa de mineralización, pueden explicar la abundancia de hongos, pero a la vez una mayor competencia por los recursos. Se hace necesario entonces, que los HSP desarrollen estrategias para la adquisición del fosfato necesario para las funciones de síntesis celular y metabolismo, entre ellas, la secreción de ácidos orgánicos (De Oliveira *et al.,* 2014; Chiou y Lin, 2011; Li *et al.,* 2009) o de fitasas (Jain y Pandey, 2016), que comprenden un grupo específico de fosfatasas, las cuales actúan sobre el fitato e hidrolizan el enlace éster que existe entre el P y el C de la materia orgánica, permitiendo así la liberación del P para los microorgansimos y las plantas. Mecanismo que pueden evidenciarse ambientes de alta fijación anteriormente discutidos.

En síntesis, la fijación de P así como los contenidos y tipos de MO (lábil o estable), pueden explicar mayor abundancia de HSP en los suelos derivados de cenizas volcánicas.

En términos de la variable fijación de P, lo anterior es consistente con lo registrado por Osorio y Habte (2001), quienes encontraron en un Andisol con alta capacidad de fijación de P ($P_{0.2}$: 1100 mg kg^{-1}) microorganismos con mayor efectividad para disolver RP que los

hallados en un Oxisol ($P_{0.2}$: 350 mg kg^{-1}) y particularmente mayor que los encontrados en un Mollisol ($P_{0.2}$: 120 mg kg^{-1}) con moderada y baja fijación de P, respectivamente.

4.5 Implicaciones de los resultados

- La abundancia relativa de HSP está determinada por las diferencias que exhiba el suelo para alcanzar el nivel de $P_{0.2}$ en solución y sus contenidos de MO estable; dado que, por tratarse de organismos heterótrofos, la abundancia de sustancias orgánicas lábiles determinan la fuente de C y de energía para los mismos.

- El pH del medio obtenido de la prueba no explica satisfactoriamente el fenómeno de solubilización de la RP. Es necesario entonces, considerar la concentración y diversidad de los AO generados para una acertada selección de los HSP.

- La producción de AO como ruta metabólica constituye un desgaste energético significativo (drenaje de C) de los HSP y por ende limita su crecimiento en condiciones de laboratorio. Por tal razón, la variable crecimiento no debe considerarse como único criterio de selección de HSP efectivos

- Se reconoce a cf. *Phlebia subserialis* como HSP. La literatura lo reporta en la degradación de sustancias orgánicas de carácter lábil

4.6 Bibiografía

Acevedo, E., Galindo-Castaneda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology 80*, 26-33.

Adeleke, R., Nwangburuka, C., & Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African Journal of Botany*, *108*, 393-406.

Arrieta, A. M., Iannone, L. J., Scervino, J. M., Vignale, M. V., & Novas, M. V. (2015). A foliar endophyte increases the diversity of phosphorus-solubilizing rhizospheric fungi and mycorrhizal colonization in the wild grass Bromus auleticus. *Fungal Ecology*, *17*, 146-154.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local aligment search tool. (1990). J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Al-Thyabat, S., & Zhang, P. (2015). In-line extraction of REE from Dihydrate (DH) and HemiDihydrate (HDH) wet processes. *Hydrometallurgy*, *153*, 30-37.

Aung, K. M. M., & Ting, Y. P. (2005). Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. *Journal of biotechnology*, *116*(2), 159-170.

Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India.*Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15 (1), 169-178.

Belboom, S., Szöcs, C., & Léonard, A. (2015). Environmental impacts of phosphoric acid production using di-hemihydrate process: a Belgian case study. *Journal of Cleaner Production*,*108*, 978-986.

Berg, B. (2017). Decomposing litter; limit values; humus accumulation, locally and regionally. *Applied Soil Ecology*. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.026 In Press

Bojinova, D., Velkova, R., & Ivanova, R. (2008). Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, *99* (15), 7348-7353.

Bünemann, E. K. (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus–A review. *Soil Biology and Biochemistry*, *89*, 82-98.

Calvaruso, C., Turpault, M. P., & Frey-Klett, P. (2006). Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *72* (2), 1258-1266.

Chiou, T. J., & Lin, S. I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annual review of plant biology*, *62*, 185-206.

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, *19* (2), 292-305.

Coutinho, F. P., Felix, W. P., & Yano-Melo, A. M. (2012). Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. *Ecological Engineering*,*42*, 85-89.

De Oliveira M., G.; Moreira DE F. A.L.; Pereria L., O.; Da Silva I., R.; Vassilev, N., B.; Costad, D., M. (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Annals of Microbiology 64 (1), 239-249.

Deng, W., Wang, Y., & Yan, N. (2016). Production of organic acids from biomass resources. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, *2*, 54-58.

Dwivedi, B. S., Singh, V. K., & Dwivedi, V. (2004). Application of phosphate rock, with or without Aspergillus awamori inoculation, to meet phosphorus demands of rice–wheat systems in the Indo–Gangetic plains of India. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *44* (10), 1041-1050.

Efthymiou, A., Grønlund, M., Müller-Stöver, D. S., & Jakobsen, I. (2018). Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected *Penicillium* strains. *Soil Biology and Biochemistry*, *116*, 139-147.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia – FNC-. 2013. Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Chinchiná: FNC: CENICAFE, 3 vols.

Gaind, S. (2016). Phosphate dissolving fungi: Mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. *Microbiological research*, *193*, 94-102.

Haq, I. U., Ali, S., & Iqbal, J. (2003). Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, *38*(6), 921-924.

International Fertilizer Indutry Association (IFA). (2013). Fertilizer outlook 2013-2017. 81° IFA annual conference. Chicago (USA), 20-22 may. 632p.

Jain, R., & Pandey, A. (2016). Soil enzymes and microbial endophytes as indicators of climate variation along an altitudinal gradient with respect to wheat rhizosphere under mountain ecosystem. *Rhizosphere*, *2*, 75-84.

Jain, J., & Singh, B. (2016). Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. Process Biochemistry, 51 (2), 159-169.

Jain, R., Saxena, J., & Sharma, V. (2014). Differential effects of immobilized and free forms of phosphate-solubilizing fungal strains on the growth and phosphorus uptake of mung bean plants. Annals of microbiology, 64 (4), 1523-1534.

Juo, A. S. R., & Fox, R. L. (1977). Phosphate Sorption Characteristics Of Some Bench-Mark Soils Of West Africa. Soil Science, 124 (6), 370-376.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. Archives of Agronomy and Soil Science, 56(1), 73-98.

Kumar, A., & Rai, L. C. (2017). Soil Organic Carbon and Availability of Soil Phosphorus Regulate Abundance of Culturable Phosphate Solubilizing Bacteria in Paddy Fields of the Indo-Gangetic Plain. *Pedosphere*. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60403-X . In Press

Lazo, D. E., Dyer, L. G., & Alorro, R. D. (2017). Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. *Minerals Engineering*, *100*, 115-123.

Lin, B., Hua, M., Zhang, Y., Zhang, W., Lv, L., & Pan, B. (2017). Effects of organic acids of different molecular size on phosphate removal by HZO-201 nanocomposite. *Chemosphere*, *166*, 422-430.

Li, X. F., Zuo, F. H., Ling, G. Z., Li, Y. Y., Yu, Y. X., Yang, P. Q., & Tang, X. L. (2009). Secretion of citrate from roots in response to aluminum and low phosphorus stresses in *Stylosanthes*. *Plant and soil*, *325* (1-2), 219-229.

Matta, S., Stephan, K., Stephan, J., Lteif, R., Goutaudier, C., & Saab, J. (2017). Phosphoric acid production by attacking phosphate rock with recycled hexafluosilicic acid. *International Journal of Mineral Processing*, *161*, 21-27.

Mahecha-Vásquez, G., Sierra, S., & Posada, R. (2017). Diversity indices using arbuscular mycorrhizal fungi to evaluate the soil state in banana crops in Colombia. *Applied Soil Ecology*, *109*, 32-39.

Miller, A. P., & Arai, Y. (2017). Effects of extraction time and phosphorus speciation on soil test phosphorus data: A case study of Illinois agricultural soils. *Geoderma*, *305*, 62-69.

Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., & Tewari, R. (2008). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (Aspergillus awamori and Penicillium citrinum) on the yield of chickpea (Cicer arietinum L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, *40* (3), 718-727.

de la Luz Mora, M., Demanet, R., Acuña, J. J., Viscardi, S., Jorquera, M., Rengel, Z., & Durán, P. (2017). Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure. *Applied Soil Ecology*, *115*, 19-26.

de Oliveira Mendes, G., de Freitas, A. L. M., Pereira, O. L., da Silva, I. R., Vassilev, N. B., & Costa, M. D. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of microbiology*, *64* (1), 239-249.

Osorio V., N. W. (2011). Effectiveness of Phosphate Solubilizing Microorganism in Increasing Plant Phosphate Uptake and Growth in Tropical Soils. In: Dinesh, M. (ED). Bacteria in Agrobiology: Plant nutrient management. Springer NY (USA). 65-80.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2015). Effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in tropical soils with contrasting phosphate sorption capacity. *Plant and Soil*, *389* (1-2), 375-385.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2014). Soil phosphate desorption induced by a phosphate-solubilizing fungus. *Communications in soil science and plant analysis*, *45* (4), 451-460.

Osorno, L., & Osorio, N. W. (2014). Effect of carbon and nitrogen source and concentration on rock phosphate dissolution induced by fungi. *Journal of Applied Biotechnology*, *2* (2), 32.

Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphrous acquisition. *Applied Soil Ecology*, *86*, 41-54.

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, *17*, 362-370.

Rolewicz, M., Rusek, P., & Borowik, K. (2017). Obtaining of granular fertilizers based on ashes from combustion of waste residues and ground bones using phosphorous solubilization by bacteria Bacillus megaterium. *Journal of Environmental Management*. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.004, In press.

Roy, E. D., Willig, E., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Vazquez, F. F., Pegorini, L., & Porder, S. (2017). Soil phosphorus sorption capacity after three decades of intensive fertilization in Mato Grosso, Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *249*, 206-214.

Saravanakumar, K., Arasu, V. S., & Kathiresan, K. (2013). Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of Avicennia marina. *Aquatic botany*, *104*, 101-105.

Shoji, S. Nanzyo, M. & Dahlgren, R. (1994). "Volcanic ash soils: genesis, properties and utilization." Amsterdam (Holanda), Elsevier, 288 p. Ing. (Developments in Soil Science Vol. 21).

Shoji, S., & Takahashi, T. (2002). Environmental and agricultural significance of volcanic ash soils. *Global Environmental Research-English Edition-*, *6* (2), 113-135.

Singh, H., & Reddy, M. S. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology*, *47* (1), 30-34.

Stamford, N., P.; Santos, P., R.; Freitas, A., D.S.; Dias, S., H. L.; & Lira, M. A. (2007). Agronomic efectiveness of biofertilizers with phosphate rock. Bioresource and Biotechnology 98 (9), 1311-1318.

Sylvia, M., D.; Fuhrman, J., J.; Hartel, G., P.; & Zuberer, A., D. (1999). Principles and applications of soil microbiology. Editado En: Estados Unidos. 550p.

Tian, J., Boitt, G., Black, A., Wakelin, S., Condron, L. M., & Chen, L. (2017). Accumulation and distribution of phosphorus in the soil profile under fertilized grazed pasture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *239*, 228-235.

Tsuyama, T.; Yamaguchi, M.; Kamei, I. Accumulation of sugar from pulp and xylitol from xylose by pyruvate decarboxylese – negative white- root fungus *Phlebia* sp. MG-60. Bioresour Technol. 2017 Aug;238:241-247. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.015. Epub 2017 Apr 7.

Velásquez, G., Ngo, P. T., Rumpel, C., Calabi-Floody, M., Redel, Y., Turner, B. L., & de la Luz Mora, M. (2016). Chemical nature of residual phosphorus in Andisols. *Geoderma*, *271*, 27-31.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus Penicillium. *Studies in Mycology*, *78*, 343-371.

Wendling, L. A., Blomberg, P., Sarlin, T., Priha, O., & Arnold, M. (2013). Phosphorus sorption and recovery using mineral-based materials: sorption mechanisms and potential phytoavailability. *Applied geochemistry*, *37*, 157-169.

Whitelaw, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, *69*, 99-151.

Wyciszkiewicz, M., Saeid, A., Dobrowolska-Iwanek, J., & Chojnacka, K. (2016). Utilization of microorganisms in the solubilization of low-quality phosphorus raw material. *Ecological Engineering*, *89*, 109-113.

Xiao, P., Mori, T., Kamei, I., Kiyota, H., Takagi, K., & Kondo, R. (2011). Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus Phlebia. *Chemosphere*, *85* (2), 218-224.

Xiao, C. Q., Chi, R. A., Huang, X. H., Zhang, W. X., Qiu, G. Z., & Wang, D. Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering*, *33* (2), 187-193.

Yadav, H., Gothwal, R. K., Nigam, V. K., Sinha-Roy, S., & Ghosh, P. (2013). Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacterium *Brevibacillus* sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2* (3), 217-225.

Zhao, L.; Zhang, Y. Q. (2015). Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of Trichoderma asperellum Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, *14* (8), 1588-1597.

Zhao, K., Xu, R., Zhang, Y., Tang, H., Zhou, C., Cao, A., & Guo, H. (2017). Development of a novel compound microbial agent for degradation of kitchen waste. *Brazilian Journal of Microbiology*.

5. Capítulo 4. Plant phosphorus uptake and growth promotion of coffee seedlings by inoculation of a mycorrhizal fungus at different levels of phosphorus in soil's solution

5.1 Resumen (Abstract)

Phosphorus (P) is necesary in coffee seedlings. To supply its requierements, coffee growers usually apply vermicompost made of coffee pulp or di-ammonium phosphate (DAP) fertilizer. Nnevertheless, coffee pulp is unsuficient in many farms to obtain the organic fertilizer required, and the DAP has high cost. In order to solve the cited problem, the use of of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can be contribute to enhance plant P uptake and growth of coffee seedlings. A greenhouse experiment was conducted to stablish the effect of *Rhizoglomus fasciculatum* fungus on enhancing plant P uptake and growth in coffee seedlings under three levels of P in the soil solution. For this propose, coffee seedlings C. arabica cv. Colombia were inoculated with the cited AMF at 0.002, 0.02, and 0.2 mg L^{-1} of P in the soil solution. Mycorrhizal colonization was only observed when the plants were grown in the inoculated substrate, regardless of the P level in the soil solution (0% under uninoculated treatment, and 9 to 54% according to P level in the soil solution). Shoot dry weight and P foliar concentration were significantly affected by the P concentration in soil solution, the AMF inoculation, and the interaction between both factors. These results suggest that *R. fasciculatum* is an adequate AMF to promote plant growth

and P uptake for coffee seedlings cv. Colombia if the inoculum is applied at P 0.02 mg L^{-1} of P level in the soil solution.

5.2 Introduction

Coffee represents one of the most important agricultural commodities produced in Colombia (Barjolle *et al.,* 2017). Currently, this country has an area of 914156 hectares planted for coffee, 75% corresponding to Colombia and Castillo® varieties developed by FNC – Cenicafé, which are resistant to Coffee Leaf Rust disease; they are highly productive and have an outstanding physical and beverage qualities (FNC, 2017). The major concern for Colombian coffee growers is to maintain high production levels at a low cost, because coffee contributes significantly to the national productivity and gross domestic product, and it supports approximately 561 000 families that depend of this crop nationwide, most of the very small farmholders (FNC, 2014).

In the Colombian coffee growing zone, coffee plants have higher demand for phosphorus (P) during nursery stage and vegetative growth. These requirements, which are independent of soil type, usually correspond to a dose of di-ammonium phosphate (DAP) of 250 kg/ha (Sadeghian and González, 2012; Ávila *et al*. 2007). Nevertheless, the coffee growers perform their activity on a large diversity of environments, climates and soil types located along the Andes Mountains, mostly derived from volcanic ashes, and other type of soil genesis, which have different P fixation potential. Under these conditions, when the same amounts of P fertilizer are applied they will generate high or insufficient availability of P in the roots zone among soils, conducing to an increase of production costs, considering that the whole consumption of P fertilizers in Colombia depends on imports from overseas (DNP, 2009), and fertilizers are highly depend on international oil price. In addition, this practice can cause environmental concerns (Tian *et al*., 2017; Ni and Wang, 2015). On the other hand, it has been recognized that the organic amendments, such as vermicompost, which is mainly obtained from decomposing coffee pulp and berries processing debris, it contains significant nutrient levels that could be sufficient to ensure the needs of plant

growth during coffee plants nursery stage (Díaz *et al.,* 2008). Nevertheless, in many farms, the source to obtain the required organic fertilizer is limited to the reduced small size and production level (Rendón *et al.,* 2015).

One alternative to solve this problem is the biotechnological use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which can enhance plant P uptake and growth of coffee seedlings (Osorio y Habte, 2014; Orozco, 1988; Rivillas and Dodd, 1996). This practice is environmental friendly (Cardoso and Kuyper, 2008) with low cost, contributing to reduce applications of P fertilizers (Rai *et al*. 2013; Jaramillo and Osorio, 2009). In addition, it will become an important tool and add value for another type of coffee producers and consumers, such as organic managed coffee production systems (Sepúlveda *et al*., 2016), or where chemical synthesis fertilizers use is restricted or limited (Chiputwa *et al.,* 2015).

Several authors (De Beenhouwer *et al.* 2015, Chanie and Assefa 2013, Lebrón *et al.* 2012, and Bolaños *et al.* 2000), have published about AMF colonization in different *Coffea arabica* cultivars. However, they do not deepen about the relationship between AMF colonization and the coffee plant behavior according to the soil fertility status, neither if the symbiosis level explains an adequate plant development and coffee production.

Since little is known in Colombia about the effectiveness of mycorrhizal inoculation in different coffee cultivars across a diversity of soil types, particularly when the level of soil available P commonly is variable, the hypothesis of this study was that P uptake by the plant and growth promotion of coffee seedlings due AMF inoculation depends on the soil P availability. Our aim was to evaluate the response of coffee seedlings *C. arabica* cv. Colombia to the inoculation of the AMF *Rhizoglomus fasciculatum* under different levels of P in the soil solution.

5.3 Materials and methods

The study was carry out under greenhouse conditions of the Soil Microbiology Laboratory at the National University of Colombia in Medellín (6°15N, 75°35´W, 1495 m altitude). In order to achieve the objective, a sub-superficial (30-50 cm) soil sample from a Bt horizon

(Paleudult, collected from the El Volador hill at Medellin), was air-dried, sieved through a 4-mm sieve, mixed with quartz (soil:quartz ratio of 2:1), and autoclaved at 120°C and 0.1 MPa for one hour. Based on a soil test the following compounds were applied (per soil kg): 2 g calcium carbonate, 436 mg of ammonium sulfate, 1550 mg of calcium sulfate, 980 mg of magnesium sulfate, 5 mg of Fe- EDTA, 5 mg of Cu-EDTA, % mg Zn-EDTA, and 5 g borax.

A soil P adsorption isotherm was conducted (Fox and Kamprath, 1970) to determine the P requirement to achieve three levels of P in soil solution: 0.005, 0.02, and 0.2 mg L^{-1}. It was based on adding KH_2PO_4 at 0, 950 and 2800 mg kg^{-1}, respectively, and mixed thoroughly. To balance the level of potassium added, 1533 and 1066 mg of potassium sulfate per kg of substrate were applied at the lowest and medium level of P. Plastic black bags (17x23 cm) recommended to grow coffee seedling at the nursery stage were filled each with 1.8 kg (dry basis) of the amended and sterile mixture of soil and quartz. Then, the substrate was either uninoculated (check control) or inoculated with 50 g of a crude mycorrhizal inoculum, which was mixed throughout. The inoculum per bag contained 250 spores of *Rhizoglomus fasciculatum* per gram from Soil Microbiology Laboratory of National University of Colombia, which was multiplied under corn and sorghum roots conditions

Seedlings of coffee (*C. arabica* cv. Colombia) grown in a sterile substrate for 60 days were transplanted into the P-amended and inoculated/unioculated substrate. A thin layer of fine quartz was applied on the surface of each pot to prevent cross contamination. The seedlings were growing there until 150 days under sunlight exposure. The substrate was watered with distilled water to maintain it at 50-60% of the maximum water holding capacity. To prevent plant nutritional deficiencies 50 cm^3 of P-free Hoagland's solution were supplied to each bag once a week.

The experimental design was completely randomized; treatments had a factorial arrangement 2x3 (two levels of mycorrhizal inoculation: inoculated and uninoculated) and three levels of soil solution P). Each treatment had five replicas. The foliar P content was monitored overtime at 30, 50, 70, 92, 110, 130, and 150 days after seedlings' transplanting (Aziz and Habte, 1987). To this purpose, from each plant, a leaf-disk (6 mm in diameter) was collected from the youngest fully extended mature leaf, then it was dried until ashed in

a muffle furnace (500°C, 3 h) and then dissolved in 10 mL of distilled water. The P determination was measured by the blue-molibdate method (Murphy and Riley, 1962). At harvest (150th day), the shoot dry weight (SDW, stem and leaves) was determined after oven-dry the samples at 60ºC for 96 h.

In addition, mycorrhizal colonization was determined in fine roots, which were washed with water, cleared by immersion in KOH (10 % m/v) for 24 h and then acidified with HCl (10%). After that, the root samples were stained with 0.15% of fucshin acid (Kormanik et al., 1980) and the extent of root colonization was determined by the method of grid-line intersection (Giovannetti and Mosse, 1980). For this propose, stained roots fragments were spread in petri plates with grid lines and then, the typical AMF structutres were examined under a stereo microscope at 40x magnification.

The treatments effects were evaluated by an Anova (F-tests) and the interaction effect by a Contrasts test. Both tests were performed with SAS version 9.4 using a P-value ≤ 0.05.

5.4 Results

The mycorrhizal colonization was only observed in all the plants grown in the inoculated substrate, regardless the P level in soil solution. In this sense, colonization was 0% under uninoculated treatment (check control), and varied betwenn 9% and 54% according to P level in the soil solution (Figure 5-1)

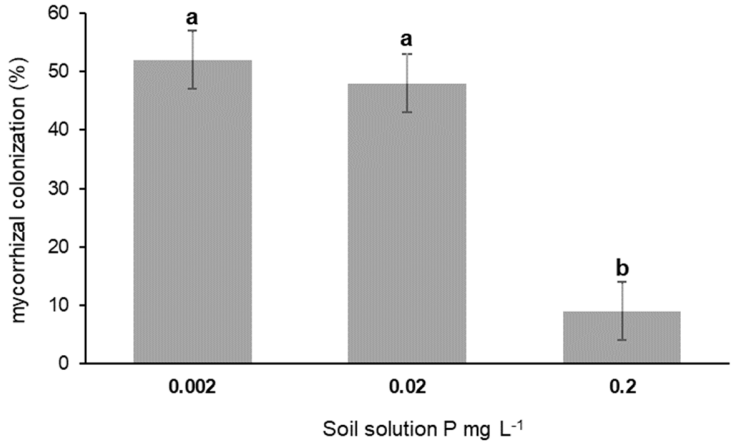


Figure 5-1. Mycorrhizal colonization percentage in *C. arabica* cv. Colombia plants grown in a soil with inoculated AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in the soil solution. Bars represent standard error.

The SDW was significantly affected by the P concentration in soil solution, the AMF inoculation, and the interaction between both factors (Table 5-1). For instance, at 0.002 mg L^{-1} level, the AMF inoculation did not affect the SDW, values, which fluctuated between 0.39 and 0.52 g/plant in average (Figure 5-2). By contrast, at 0.02 mg L^{-1} level, the AMF inoculation with *R. fasciculatum* significantly increased the SDW by 3.05 times respect to the uninoculated check control (1.03 g/plant average). Similarly, at 0.2 mg L^{-1} level, the SDW was significantly affected by the inoculation with *R. fasciculatum* (3.13 g/plant average); meanwhile the uninoculated check control was 2.07 g/plant average.

The statistical analysis showed that mycorhizal colonization percentage was not different between 0.002 mg L^{-1} and 0.02 mg L^{-1} P levels, but these two were statistically different (α= 0.05) to colonization at 0.2 mg L^{-1} P level. It is interenting that at the highest P leve, AMF root colonization was the lowest. These results indicate that young coffee plants or seedlings response depends on the P level in the soil solution.

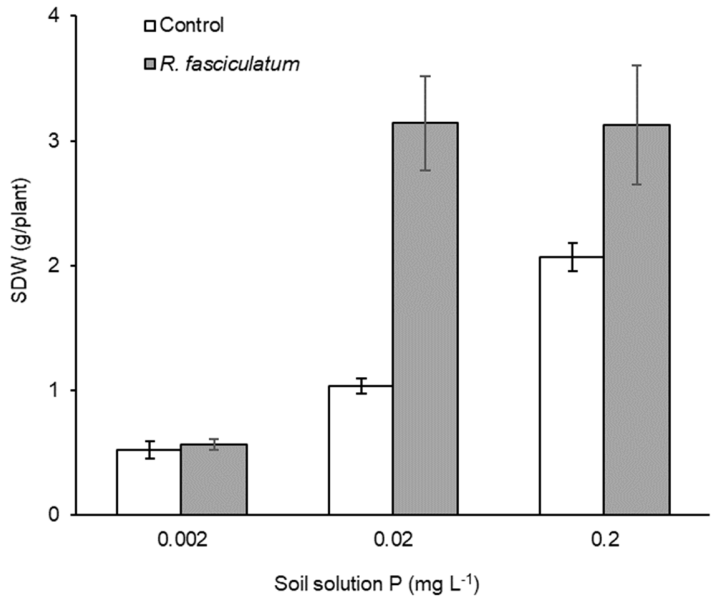


Figure 5-2. Shoot dry weight (SDW) of coffee *C. arabica* cv. Colombia young plants or seedlings grown in a soil inoculated with AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in soil solution. Bars represent standard error.

The P foliar concentration was significantly affected by the interaction soil P level by AMF inoculation only at the end of the study (Table 5-1). At the 0.002 mg L^{-1} level, the AMF did not promote changes on the foliar P content at any time, and values ranged from 0.07 to 0.15 %. By contrast, at the 0.02 mg L^{-1} level, the inoculation with *R. fasciculatum* significantly increased this nutrient in the leaf tissues after 110 days of growing. For instance, at 110 days the uninoculated plants had values between 0.10 and 0.13 %, whereas the inoculated plants had between 0.17 to 0.19%. On the other hand, at the 0.2 mg L^{-1} level, the AMF inoculation did not affect significantly the foliar P content (Figure 5-3).

Table 5-1. Statistical significant P-values from the analysis of variance tests for P foliar concentration in coffee plants. NS: not significant.

Factor	**SDW**	**P foliar content at different days µg/leaf disc**						
		30 d	**50 d**	**70 d**	**92 d**	**110 d**	**130 d**	**150 d**
AMF inoculation (A)	0.0002	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Soil Solution (B)	<0.0001	NS	<0.0001	<0.0001	0.0021	<0.0001	<0.0001	<0.0001
AxB	0,0082	NS	NS	NS	NS	NS	<0.0001	<0.0007

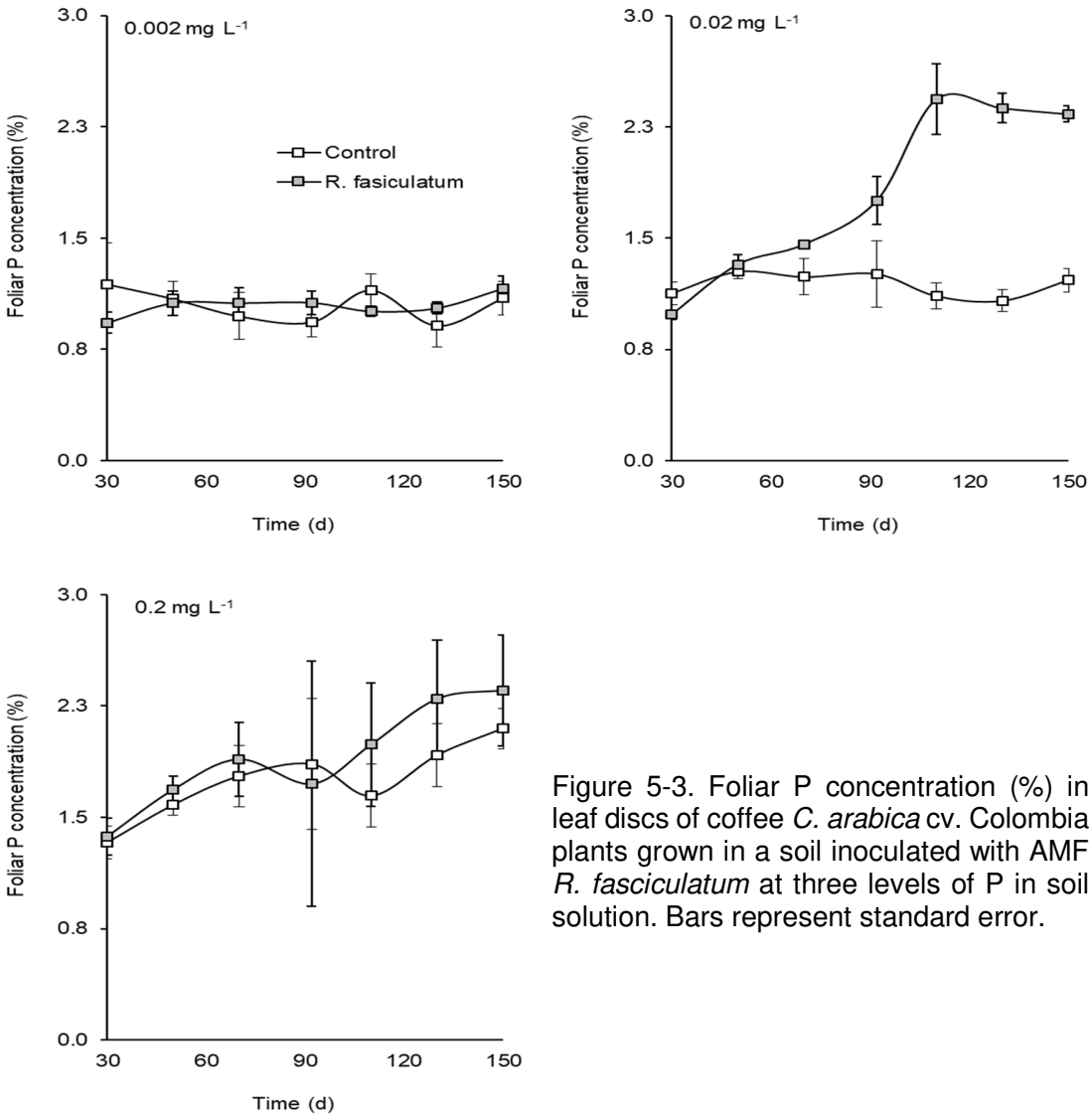


Figure 5-3. Foliar P concentration (%) in leaf discs of coffee *C. arabica* cv. Colombia plants grown in a soil inoculated with AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in soil solution. Bars represent standard error.

In addition, the P foliar content (µg/foliar disc) showed a similar behavior to the P concentration (%). At the 0.002 mg L^{-1}level, the AMF did not promote increase of the foliar P content at any time, and values ranged from 0.93 to 1.19 µg/leaf disc. By contrast, at the 0.02 mg L^{-1} level, the inoculation with *R. fasciculatum* significantly increased this nutrient in the leaf tissues, particularly after 110 days of growing. For example, uninoculated plants had values among 1.11, 1.80, and 1.22 µg/leaf disc at 110, 130, and 150 days, respectively, while the inoculated plants had 2.44, 2.38 and, 2.34 µg/leaf disc for the same days

respectively. These results represent increases of P content of 119%, 32%, and 90 %, respectively (Figure 5-4).

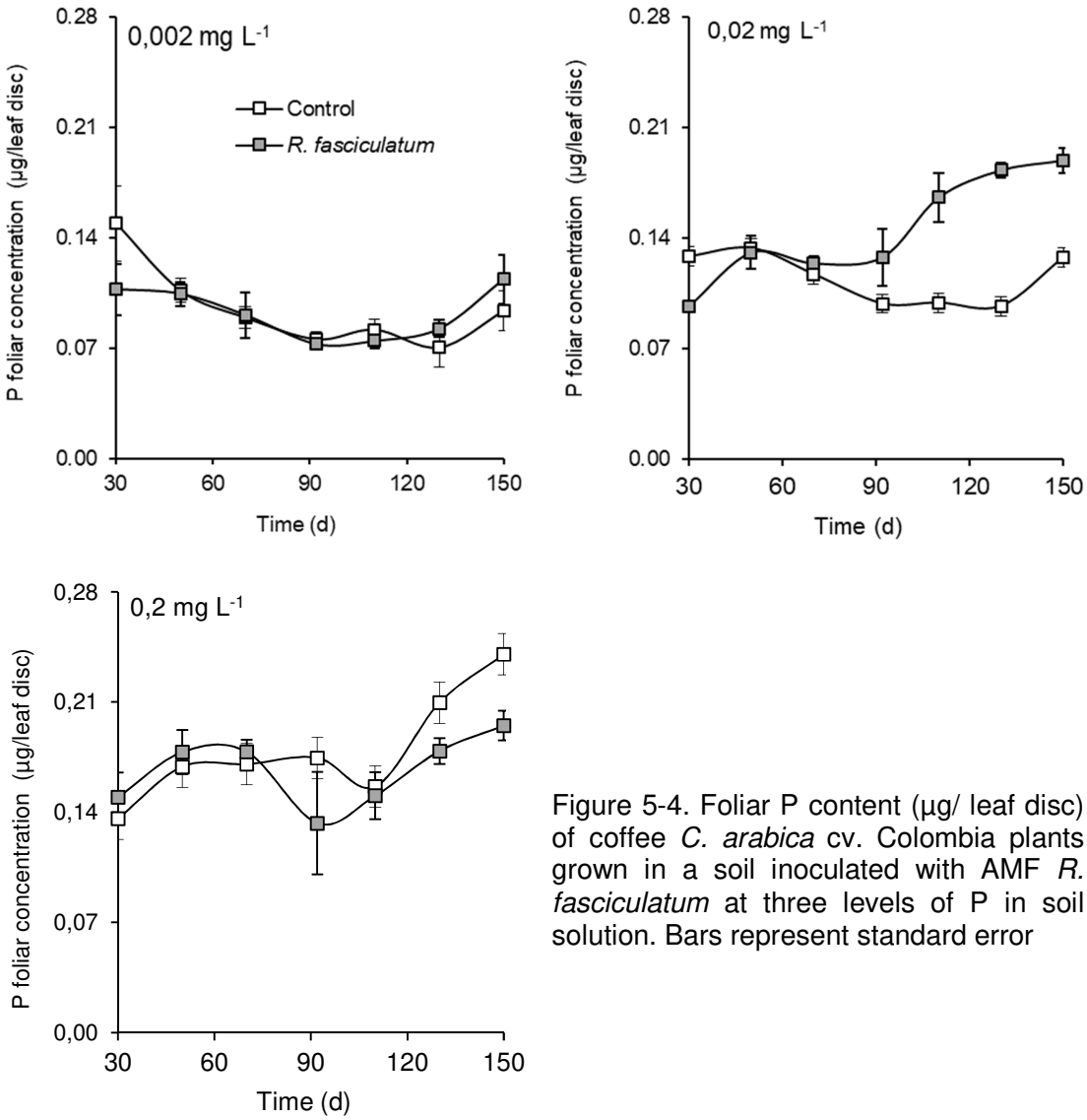


Figure 5-4. Foliar P content (µg/ leaf disc) of coffee *C. arabica* cv. Colombia plants grown in a soil inoculated with AMF *R. fasciculatum* at three levels of P in soil solution. Bars represent standard error

5.5 Discussion

The results suggest that the use of *R. fasciculatum* is adequate to promote plant growth and P uptake for coffee seedlings cv. Colombia. The results agree with those of Jaramillo

and Osorio (2009), in which the mycorrhizal and effectiveness dependency of coffee seedlings of Colombia and Caturra varieties were studied at the same soil P levels, in a similar sterile Bt horizont of the Ultisol of this study. Recently, Cuervo (2017), working with a sterile Bw horizon which belonged to Chinchina Unit, and with the same AMF and soil P levels, found for the coffee varieties Castillo® Naranjal, Castillo® Tambo and Tabi comparable results in SDW and foliar P uptake. In that case, the SDW increase with AMF inoculation was 10 times higher in respect to the uninoculated plants. Earlier works of Habte and Biitenbender (1999) in an Oxisol from Hawaii with coffee seedlings cv. Typica, showed the positive response using *Glomus aggregatum*. The last cases including our study were carry out in soils where the P fixation is catalogued between intermediate and high.

The lack of response at the lowest level of soluble P can be explained because this concentration is extremely low for both, plant and AMF. In others words, the low P soil content is a limiting factor to AMF and to plant interaction (Osorio and Habte, 2015). Since the plant cannot grow properly under such condition, it cannot share C with the mycorrizal fungus. The plants invest near to 20 to 30% of the fixed carbon compounds from photosynthesis process, in order to satisfy the nutritional requirements to the fungus. This carbon goes through the extra radical hyphae; they operate as an extension of the roots system (Lebrón *et al*., 2012), and acquire P from regions surrounding and beyond of the plant roots zone (Eskandari *et al*., 2017; López *et al*., 2014).

An opposite scenario is at the highest P concentration, where the AMF inoculation seems to be unnecessary, because there is enough P for plant growth and the magnitude of the response is lower (Harrison, 1999). In fact, several authors had published that AMF inoculation at that high level of soil P can produce negative effects due to an imbalance associated to an expensive metabolic cost required to support with Carbon a micro-symbiont system that does not improve the plant performance much (Wang *et al*., 2017; Roth and Paszkowski, 2017). Per instance, Jaramillo and Osorio (2009) indicatednegative effects in coffee seedlings cv. Caturra and cv. Colombia using *Glomus fistulosum* inoculum at 0.2 mg L^{-1} level. In addition, Rai *et al.* (2013) considered this phenomenon as a "parasitic effect"; but this is likely controlled by the AMF specie as well.

It is also possible that when the P level in the soil is as high as 0.2 mg L^{-1}, it can decrease the availability of other essential nutrients, such as Zn (Zhang *et al.,* 2017; Ozdemir *et al.,* 2010; Sewnet and Tuju, 2013; Bhattacharya and Bagyaraj, 2002), affecting as well the functioning, formation and multiplication of AM fungi in the rhizosphere (Chanie y Assefa, 2014; Dutt *et al*., 2013).

In summary, under our experimental conditions, this study clearly demonstrated a positive effect of AMF inoculation on SDW and foliar P content on coffee seedlings, only if the P level in the soil solution is 0.02 mg L^{-1}. According to our results, the use of AMF in coffee plants is controlled by P level in the soil solution. If the P concentration in soil solution is as low as 0.002 mg L^{-1}, the mycorrhizal inoculation proceeds only with P fertilization to reach an optimal P level for the AMF association. On the other hand, if P level in the soil solution is 0.02 mg L^{-1}, the AMF inoculation can be used without any P additional fertilization. By contrast, when P concentration in soil solution is 0.2 mg L^{-1}, the AMF inoculation seems to be unnecessary, once again, under our experimental conditions. So, the AMF use in coffee seedlings should be associated always with soil test analysis first.

Finally, according to the results about P uptake after 110 days of plants growing, in a practical sense, as reported by Franca *et al*. (2014), the coffee seedlings can be inoculated with an adequate AMF early, during the substrate preparation when establishing the nurseries, in order to achieve better responses.

5.6 References

Avila, W., Sadeghian, S., Sanchez, P., & Castro, H. (2007). Producción de almácigos de café en el departamento de Santander con diferentes fuentes de materia orgánica y de fósforo. *Avances Técnicos Cenicafé*, 356, 12p.

Aziz, T., & Habte, M. (1987). Determining vesicular–arbuscular mycorrhizal effectiveness by monitoring P status of leaf disks.*Canadian Journal of Microbiology*, *33* (12), 1097-1101.

Barjolle, D., Quiñones-Ruiz, X. F., Bagal, M., & Comoé, H. (2017). The Role of the State for Geographical Indications of Coffee: Case Studies from Colombia and Kenya.*World Development*, 98, 105-119

Bhattacharya, S., & Bagyaraj, D. J. (2002). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal isolates on arabica coffee (Coffea arabica L.). *Biological agriculture & horticulture*, *20* (2), 125-131.

Bolaños, M., Rivillas, C., & Suárez, S. (2000). Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera Colombiana. *Cenicafé*, *51* (4), 245-262.

Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, ecosystems & environment*, *116* (1), 72-84.

Chanie S., T., Assefa T, S. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with shade trees and Coffea arabica L. in a coffee-based agroforestry system in Bonga, Southwestern Ethiopia. Afrika focus — Volume 26, Nr. 2— pp. 111-131

Chiputwa, B., Spielman, D. J., & Qaim, M. (2015). Food standards, certification, and poverty among coffee farmers in Uganda. *World Development*, *66*, 400-412.

Cuervo, C. J. (2017). Dependencia micorrizal de variedades de café bajo diferentes concentraciones de fosfato soluble en el suelo. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Maestría en Geomorfología y Suelos. (Tesis de M.Sc). Medellín (Colombia). 92p

De Beenhouwer, M., Van Geel, M., Ceulemans, T., Muleta, D., Lievens, B., & Honnay, O. (2015). Changing soil characteristics alter the arbuscular mycorrhizal fungi communities of Arabica coffee (Coffea arabica) in Ethiopia across a management intensity gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, *91*, 133-139.

Díaz, C., Sadeghian, S., & Morales, C. S. (2009). Cambios químicos ocasionados por encalamiento y uso de lombrinaza en la etapa de almácigo del café. Cenicafé, 59 (4), 295-309

Departamentos Nacional de Planeación de Colombia (DNP) (2009) Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario. Documento CONPES 3577. Consejo Nacional de Política Económica y Social, República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación. Bogotá, D.C. 18 de Marzo de 2009. 34p.

Dutt, S., Sharma, S. D., & Kumar, P. (2013). Arbuscular mycorrhizas and Zn fertilization modify growth and physiological behavior of apricot (Prunus armeniaca L.). *Scientia horticulturae*, *155*, 97-104.

Eskandari, S., Guppy, C. N., Knox, O. G., Flavel, R. J., Backhouse, D., & Haling, R. E. (2017). Mycorrhizal contribution to phosphorus nutrition of cotton in low and highly sodic soils using dual isotope labelling (32 P and 33 P). *Soil Biology and Biochemistry*, *105*, 37-44.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia – FNC. (2017). Sistema de información cafetera @SICA [EN LÍNEA]. Bogotá. Colombia Abril 30. 2017.

Federación Nacional De Cafeteros De Colombia – FNC. (2014). Informe del Gerente General. LXXIX Congreso Nacional de cafeteros. Por una Caficultura Competitiva. EDITADO EN: Bogotá (Colombia), FNC, 2014. 71p.

França, A. C., Carvalho, F. P., Franco, M. H., de Avelar, M., Souza, B. P., & Stürmer, S. L. (2014). Crescimento de mudas de cafeeiro inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, *9*(4).

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*, *84* (3), 489-500.

Habte, M., & Bittenbender, H. C. (1999). Reactions of coffee to soil solution P concentration and arbuscular mycorrhizal colonization. *Journal of South Pacific Agriculture*, *6*, 29-34.

Harrison, M. J. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual review of plant biology*, *50* (1), 361-389.

Jaramillo S. P.; Osorio N. W. (2009). Factores que determinan la dependencia micorrizal de las plantas. Suelos Ecuatoriales, 35 (2), 34-40.

Kormanik, P. P., Bryan, W. C., & Schultz, R. C. (1980). Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Canadian Journal of Microbiology*, *26* (4), 536-538.

Lebrón, L., Lodge, D. J., & Bayman, P. (2012). Differences in arbuscular mycorrhizal fungi among three coffee cultivars in Puerto Rico.*ISRN Agronomy*,*2012, Article ID 148042, 7 p. http://dx.doi.org/10.5402/2012/148042*.

Lopez-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annual review of plant biology*, *65*, 95-123.

Murphy, J. A., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, *27*, 31-36.

Ni, Z., & Wang, S. (2015). Historical accumulation and environmental risk of nitrogen and phosphorus in sediments of Erhai Lake, Southwest China. *Ecological Engineering*, *79*, 42-53.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2014). Soil phosphate desorption induced by a phosphate-solubilizing fungus. *Communications in soil science and plant analysis*, *45* (4), 451-460.

Osorio, N. W., & Habte, M. (2015). Effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in tropical soils with contrasting phosphate sorption capacity. *Plant and Soil*, *389* (1-2), 375-385.

Orozco, P. (1988). FH Efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas vesicular arbuscular en plántulas de café Coffea arabica. v*ar. Colombia. Suelos Ecuatoriales*,*18* (2), 213-219.

Ozdemir, G., Akpinar, C., Sabir, A., Bilir, H., Tangolar, S., & Ortas, I. (2010). Effect of inoculation with mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of grapevine genotypes (Vitis spp.). *European Journal of Horticultural Science*, 75 (3), 103-110.

Rai, A., Rai, S., & Rakshit, A. (2013). Mycorrhiza-mediated phosphorus use efficiency in plants. *Environ Exp Biol*,*11*, 107-117.

Rendon, J., Garcia, J., Gonzalez, H., & Ramirez, J. (2015). Análisis técnico económico del proceso de lombricultura en pulpa de café para la producción de abono orgánico. Cenicafé 66 (2), 7-16.

Rivillas, C., & Dodd, J. C. (1995). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on two different coffee varieties from Colombia and their biochemical detection in roots. *Kent, University of Kent. Research School of Biosciences*, *88p*.

Roth, R., & Paszkowski, U. (2017). Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, *39*, 50-56.

Sadeghian, K. S., & González, O. H. (2012). Alternativas generales de fertilización para cafetales en la etapa de producción. Chinchiná. Centro Nacional de Investigaciones de Café–Cenicafe. *Avances Técnicos Cenicafé, 424*, 8p.

Sepúlveda, W. S., Chekmam, L., Maza, M. T., & Mancilla, N. O. (2016). Consumers' preference for the origin and quality attributes associated with production of specialty coffees: Results from a cross-cultural study. *Food Research International*, *89*, 997-1003.

Sewnet, T. C., & Tuju, F. A. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with shade trees and Coffea arabica L. in a coffee-based agroforestry system in Bonga, Southwestern Ethiopia. *Afrika Focus*, *26* (2), 111-131.

Tian, J., Boitt, G., Black, A., Wakelin, S., Condron, L. M., & Chen, L. (2017). Accumulation and distribution of phosphorus in the soil profile under fertilized grazed pasture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *239*, 228-235.

Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular plant.* 10 (9), 1147-1158.

Zhang, W., Liu, D. Y., Li, C., Chen, X. P., & Zou, C. Q. (2017). Accumulation, partitioning, and bioavailability of micronutrients in summer maize as affected by phosphorus supply. *European Journal of Agronomy*,*86*, 48-59.

6. Capitulo 5. Efecto de la aplicación de HSP y el nivel de fósforo en solución, en el crecimiento de almácigos de café

6.1 Resumen

Los requerimientos de P en el café habitualmente se satisfacen con roca fosfórica (RP) o fertilizantes solubles como el fosfato di-amónico (DAP) o mono-amónico (MAP). El suministro de dichas fuentes puede ser poco efectivo dado que el P aplicado se fija en alta proporción, particularmente en suelos derivados de cenizas volcánicas. Bajo estas circunstancias, el uso de hongos solubilizadores de P (HSP) constituye una opción, sin embargo, es necesario conocer algunas variables del suelo que aseguren la efectividad en el uso de dicha biotecnología. Con el propósito de evaluar el nivel de P en el suelo requerido para que el suministro de HSP mejore el crecimiento y la absorción de P en plantas jóvenes de café y la posibilidad de sustituir o mejor complementar a través de ellos la actual recomendación de P con DAP o RP, se evaluaron dos experimentos en un suelo *Typic Melanudand* de la zona cafetera colombiana. En el primer experimento, se suministraron de manera individual los hongos *Phlebia subserialis* aislamiento CH4 y *Penicillium ubiquetum* aislamiento Ti38 a tres diferentes niveles de P en el suelo, y en el segundo experimento se inoculó, *Penicillium subserialis* aislamiento CH4, que se comparó frente a la actual recomendación que se tiene con MAP o RP para plantas jóvenes de café en etapa de vivero o almácigo. Los resultados mostraron que *P. subserialis*-CH4, contribuyó a promover el crecimiento y la absorción del elemento cuando el P en solución estaba entre 0.04 -0.07 mg L^{-1}, valores que para este suelo corresponden a entre 7 y 10 mg kg^{-1} de P por el método Bray II. Finalmente se demostró que es posible obtener los

mismos resultados cuando se suministra o inocula el citado HSP respecto a la actual recomendación de P.

6.2 Introducción

El fósforo (P) constituye un nutriente esencial para los cultivos (Zhu *et al*., 2018), particularmente para garantizar el crecimiento de la planta de café en la etapa de almácigo o vivero (Sadeghian, 2008). La fuente natural del elemento es por excelencia la materia orgánica del suelo (Acharya and Panigrahi, 2016; López, 1960); no obstante, es bien sabido que las cantidades producidas por efecto de su mineralización suelen ser insuficientes (Almeida *et al*., 2018). Por tal razón para satisfacer las necesidades del cultivo, es necesaria la aplicación de fertilizantes tanto de origen orgánico, como de tipo mineral (Minten *et al.,* 2015; Ávila *et al*., 2010). Para lograr este objetivo, los caficultores pueden hacer uso de diferentes opciones, por una parte, aprovechar la pulpa de café descompuesta o en compost como materia prima para obtener el abono requerido (Salazar, 1983), utilizar fuentes minerales locales de bajo costo y solubilidad como la roca fosfórica (RP), o aplicar fertilizantes fosfóricos solubles de síntesis química (Díaz *et al.,* 2008).

La selección de cualquiera de las alternativas mencionadas, presenta implicaciones de tipo técnico, ambiental y económico (Roy *et al.,* 2017; Tian *et al*., 2017). Por lo general la cantidad de pulpa derivada de la producción de café en el predio, suele ser insuficiente para alcanzar las cantidades del abono recomendadas o su utilización, dado que se recomienda mezclar el suelo del almácigo con la pulpa en una relación que va de 3:1 a 1:1, dependiendo del sistema de compostaje que se utilice (Salazar, 1992), y dicho material en un estado incompleto de descomposición genera intoxicaciones a las plantas de almácigo (Rendón *et al.,* 2015). El uso de RP como fuente de P puede limitarse a suelos con problemas de acidez dado que su reacción de tipo alcalino desencadenaría síntomas visibles de deficiencias de elementos menores en suelos donde el pH se encuentra por encima del nivel adecuado para el cultivo (Jiang *et al*., 2016). Finalmente, a pesar que el DAP es un fertilizante de amplia acogida en el medio y que no presenta en general

contraindicaciones de tipo agronómico para ser utilizado en esta etapa del cultivo, es bien sabido que por tratarse de un insumo importado es altamente dependiente del precio de internacional (Koppelaar *et al.,* 2013); además, es susceptible a las variaciones en los costos de la materia prima y del precio de los combustibles (Cordell *et al*., 2009).

Conscientes de la problemática citada, se requiere buscar tecnologías de bajo impacto económico y ambiental que conduzcan al caficultor a ser cada vez más competitivo. En este sentido, el uso del análisis de suelos continúa siendo una herramienta fundamental para la toma de decisiones técnicas, pero las recomendaciones derivadas de su utilización requieren de ajustes, dado que los niveles de suficiencia del elemento pueden cambiar según el tipo de suelo (Wang *et al.,* 2015; Ávila *et al*., 2010). Así mismo, las alternativas de tipo biológico o biotecnológico, específicamente aquellas que involucran hongos formadores de micorriza (HFM) y microorganismos solubilizadores de fosforo, entre ellos los hongos (HSP), pueden ser promisorios en la promoción del crecimiento de los almácigos de café, siempre y cuando se garanticen unos niveles determinados de P aprovechable (Cuervo, 2017; Jaramillo y Osorio, 2009; Habte y Biitenbender, 1999). Estos microroganismos podrían constituir una alternativa promisoria, pero es necesario conocer algunos requerimientos en el suelo que garanticen la mayor probabilidad de éxito en su formulación (de la Luz Mora *et al*., 2017; Zhao y Zhang, 2015; Owen *et al.,* 2015).

Considerando lo anterior, se plantearon como hipótesis de investigación que la inoculación con HSP puede: (i) promover el crecimiento de las plantas de café en estado de almácigo, pero el efecto está condicionado por el suelo y por el tipo de HSP utilizados y (ii) sustituir o complementar la fertilización fosfórica actualmente recomendada.

Para corroborar las hipótesis, se llevaron cabo dos experimentos cuyo objetivo fueron (i) evaluar el efecto de la aplicación de dos HSP (*Phlebia subserialis* cepa CH4 y *Penicillium ubiquetum* cepa Ti38) en el crecimiento y absorción de P por plantas jóvenes de café *C. arabica* cv. Tabi en etapa de almácigo, sembrados en dos Andisoles a varias concentraciones de P en la solución del suelo y (ii) comparar la respuesta a la aplicación de P con un fertilizante soluble, una fuente fosfórica de baja solubilidad (RP) y la inoculación con el hongo *Phlebia subserialis* cepa CH4 en un Andisol.

6.3 Materiales y métodos

Experimento 1: Efecto de la aplicación de dos HSP y el nivel de P en solución del suelo en el crecimiento y absorción de P en plantas jóvenes de café *C. arabica* cv. Tabi creciendo en un Andisol en etapa de almácigo.

Semillas de café (*Coffeea arabica*) cv. Tabi se germinaron en un sustrato de arena estéril durante 30 días, tal como lo recomienda Gaitán *et al.* (2013). Posteriormente, las plántulas de 60 días (estado de chapola) se trasplantaron a bolsas plásticas (13x23 cm) que contenían el suelo de la unidad cartográfica Timbío, el cual presenta alta capacidad para fijar P, a razón de 1 kg/bolsa (Tabla 6-1). El suelo fue esterilizado previamente con Dazomet a razón de 200 g m^{-3}. Las plántulas crecieron en una casa malla del Centro Nacional de Investigaciones del Cafe - Cenicafé Plan, ubicado en el Municipio de Chinchiná, Caldas, Colombia (5°15´34" N, 75°15´34"W) a una altitud de 1430 m.

Tabla 6-1. Características químicas del suelo seleccionado en función de la cantidad de P necesario para alcanzar el nivel de $P_{0.2}$ en la solución del suelo y sus características químicas.

Suelo	Clasificación USDA	pH	MO (%)	IM **	Concentración de P en solución del suelo (mg L^{-1})	Nivel $P_{0,2}$ (mg kg^{-1})
Timbío	*Typic melanudand*	5.2	18	1.6	0.04	619

*Cantidad requerida para obtener en solución 0,2 mg L^{-1} de solución de suelo
**IM: índice melánico, indica el grado de humificación de la MO (≤1.6 indica alta humificación)
MO: Materia orgánica

Los tratamientos consistieron en la inoculación individual sobre la superficie de los dos suelos previamente humedecidos con dos HSP (*Phlebia subserialis*-CH4 y *Penicillium ubiquetum*-TI38) a razón de 10 mL de una suspensión fungosa que contenía $1x10^8$ esporas mL^{-1} con glucosa al 10%, considerando un porcentaje de germinación de esporas superior del 95% al momento de elaborar la citada suspensión. Así mismo, se usaron tres concentraciones de P en la solución del suelo (0.04, 0.07 y 0.12 mg L^{-1}). Las concentraciones más bajas corresponden al valor original del suelo, mientras que los dos restantes (0.07 y 0.12 mg kg^{-1}) se lograron al aplicar P soluble de acuerdo a una isoterma

de adsorción de P (Fox y Kamprath, 1970; ver capítulo 2) (Tabla 6-2). Para suministrar el P se aplicó fosfato monoamónico (MAP: 10%N - 61% P_2O_5) por kg de suelo en base seca según la dosis requerida para alcanzar las concentraciones de P en solución descritas. El fertilizante correspondiente se aplicó en una sola dosis 10 días después de sembrar las plántulas. Los tratamientos con los dos niveles más bajos de P recibieron urea (30 d después del trasplante) para compensar los aportes de N del MAP. Al cabo de dos meses, se hizo una re-inoculación con los HSP correspondientes con la misma dosis y concentración sobre la superficie del suelo.

Tabla 6-2. Descripción de los tratamientos, cantidad de P en solución y su equivalente en la metodología Bray II.

Suelo	P solución (mg L^{-1})	P Bray II equivalente (mg kg^{-1})	HSP inoculado
Timbío	0.04 (nativo)	7.0	*Phlebia subserialis*-CH4
	0.07	10.0	
	0.12	13.0	
	0.04 (nativo)	7.0	*Penicillium ubiquetum*-TI38
	0.07	10.0	
	0.12	13.0	

El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos tuvieron un arreglo factorial 3x3; esto representa tres concentraciones de P en la solución del suelo y tres niveles de inoculación (control no inoculado, inoculación con *Phlebia subserialis-CH4* e inoculación con *Penicillium ubiquetum-TI38*). Cada tratamiento tuvo 9 repeticiones, para un total de 81 unidades experimentales. La unidad experimental fue la planta individual de café.

Una vez las plantas cumplieron 5 meses de edad se retiraron de manera individual de su respectiva bolsa de almácigo y se llevaron a secado en estufa ventilada (60°C) hasta obtener masa constante. Las plantas secas se pesaron para registrar su masa seca total. Posteriormente se determinó la concentración de P en el tejido a través de combustión seca (500ºC en mufla, por 5 h) y determinar la concentración de P a través del método del

azul de molibdato (Murphy y Riley, 1962). La cantidad de P absorbida en la parte aérea resultó de multiplicar la masa seca aérea y la concentración de P en el tejido.

Análisis de los resultados

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (prueba F) para detectar si los tratamientos tuvieron efectos significativos sobre las variables de interés. Cuando estos tuvieron efectos significativos se hizo una prueba de separación de medias de rangos múltiples de Duncan. En ambos casos se utilizó un nivel de significancia (P) ≤ 0.05 y se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS - centurión versión 16.0.

Experimento 2: Comparación de la respuesta de plántas de café a la aplicación de P con fertilizante soluble, una fuente de P de baja solubilidad y la inoculación con el hongo *Phlebia subserialis* (cepa CH4) en un Andisol.

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en aplicar P a razón de 4 g de P_2O_5 por bolsa de almácigo, que es la dosis actualmente recomendada para café en Colombia (Sadeghian, 2008). Para esto se aplicaron (i) una fuente soluble de P en forma de MAP (testigo relativo), (ii) una fuente de baja solubilidad como la roca fosfórica del Huila ($Ca_5(PO_4)_3(OH,F)$) equivalente a la dosis de P del tratamiento anterior (0-30-0-40) y (iii) 10 mL de una suspensión que contenía el hongo a razón de $1x10^8$ esporas mL^{-1} con glucosa al 10%.

El procedimiento llevado a cabo para la aplicación de los tratamientos fue similar al del primer experimento y el diseño experimental fue completamente al azar con 9 repeticiones.

Variables de interés

Las variables estudiadas fueron la masa seca y el contenido de P en la parte aérea, para lo cual se procedió en la misma forma descrita anteriormente.

Análisis de datos

El análisis de los resultados se hizo a través de un análisis de varianza (prueba F) y la prueba de comparación Duncan con un nivel de significancia (*P*) ≤0.05. Las pruebas se hicieron con el paquete estadístico SAS 9.4TS Level 1M1

6.4 Resultados

6.4.1 Efecto de la aplicación de HSP y el nivel de P en solución del suelo sobre el crecimiento de plantas jóvenes de café en el suelo de unidad Timbío.

Se presentaron efectos significativos de la interacción P en solución y HSP sobre la variable masa seca aérea y el contenido de P absorbido, pero no con los factores individuales (excepto con la inoculación con HSP sobre el P absorbido) (Tabla 6-3).

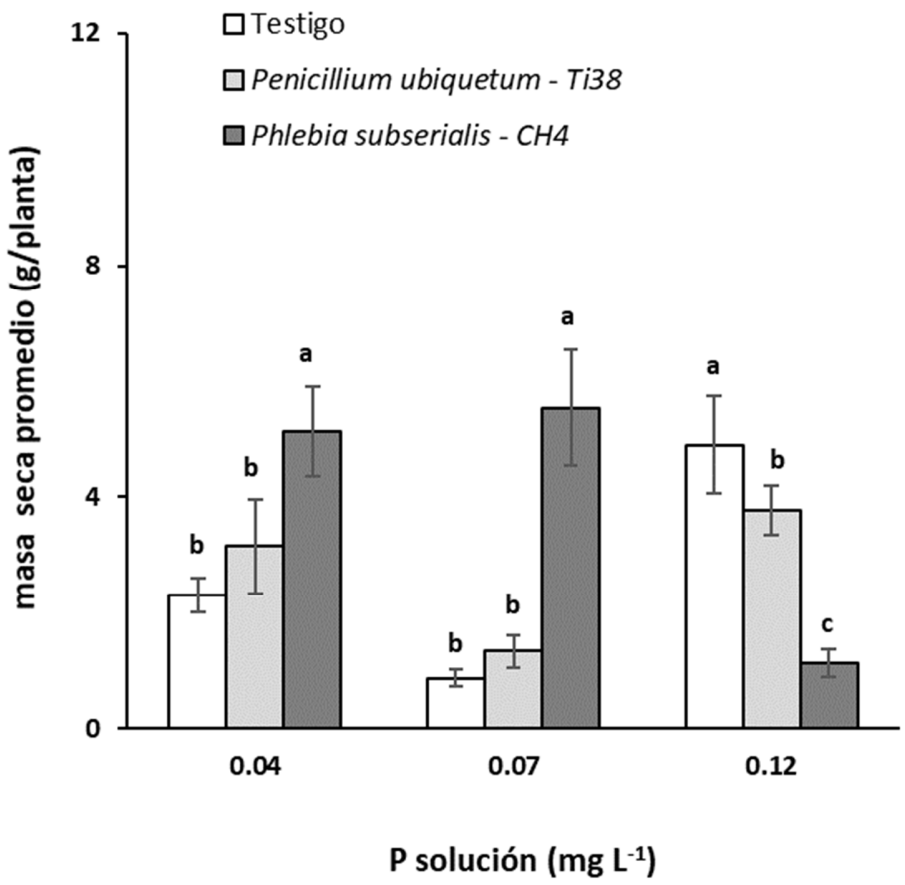
Tabla 6-3. Niveles de significancia del análisis de varianza para las variables estudiadas.

Suelo	Factor	Masa seca aérea	P total absorbido
Timbío	Concentración de P en la solución del suelo (A)	0.0680	0.3228
	Inoculación con HSP (B)	0.0650	0.0035
	Interacción A x B	<0.0001	<0.0001

A las más baja concentración de P en solución (0.04 mg L^{-1}) las plantas de café no inoculadas (testigo o control) presentaron una masa seca promedio de 2.3 g/planta en promedio, al inocular con *P. subserialis* la masa aérea aumentó significativamente a 5.1 g/planta en promedio, y al inocular con *P. ubiquetum* la masa seca no cambio significativamente con respecto al control (Figura 6-1). Al nivel de P en solución de 0.07 mg L^{-1} la situación fue similar, la masa seca también sólo aumentó significativamente al inocular con *P. subserialis*, alcanzando un valor promedio de 5.5 g/planta, mientras que las plantas no inoculados tuvieron un valor medio de 0.87 g/planta. A la concentración de P más alta (0.12 mg L^{-1}) el valor de masa seca de las plantas no-inoculadas (4.9 g/planta

promedio) fue significativamente más alto que las plantas inoculadas (3.8 y 1.1 g/planta promedio).

El contenido de P en la parte aérea tuvo un comportamiento similar. Así, a la concentración de P en solución de 0.04 mg L^{-1} las plantas de café no inoculadas (testigo control) presentaron un promedio de 2.4 mg/planta, al inocular con *P. subserialis* el nivel de P aumentó significativamente a 6.2 mg/planta en promedio; en tanto que al inocular con *P. ubiquetum* el valor no cambio significativamente con respecto al control (Figura 6-1). Al nivel de P en la solución de 0.07 mg L^{-1}, el P total absorbido también sólo aumentó significativamente al inocular con *P. subserialis*, alcanzando un valor de 5.9 mg/planta en promedio, mientras que las plantas no inoculadas tuvieron un valor medio de 0.8 mg/planta. A la concentración de P en el suelo más alta (0.12 mg L^{-1}) el valor de P absorbido de las plantas no-inoculadas (7.1 mg/planta), fue significativamente más alto que el de las plantas inoculadas, en cuyo caso los valores promedio alcanzados fueron 4.7 y 0.9 mg/planta, respectivamente.


Testigo
Penicillium ubiquetum - Ti38
Phlebia subserialis - CH4
masa seca promedio (g/planta)
12
8
4
0
a
b
b
a
b
b
a
b
c
0.04
0.07
0.12
P solución (mg L-1)

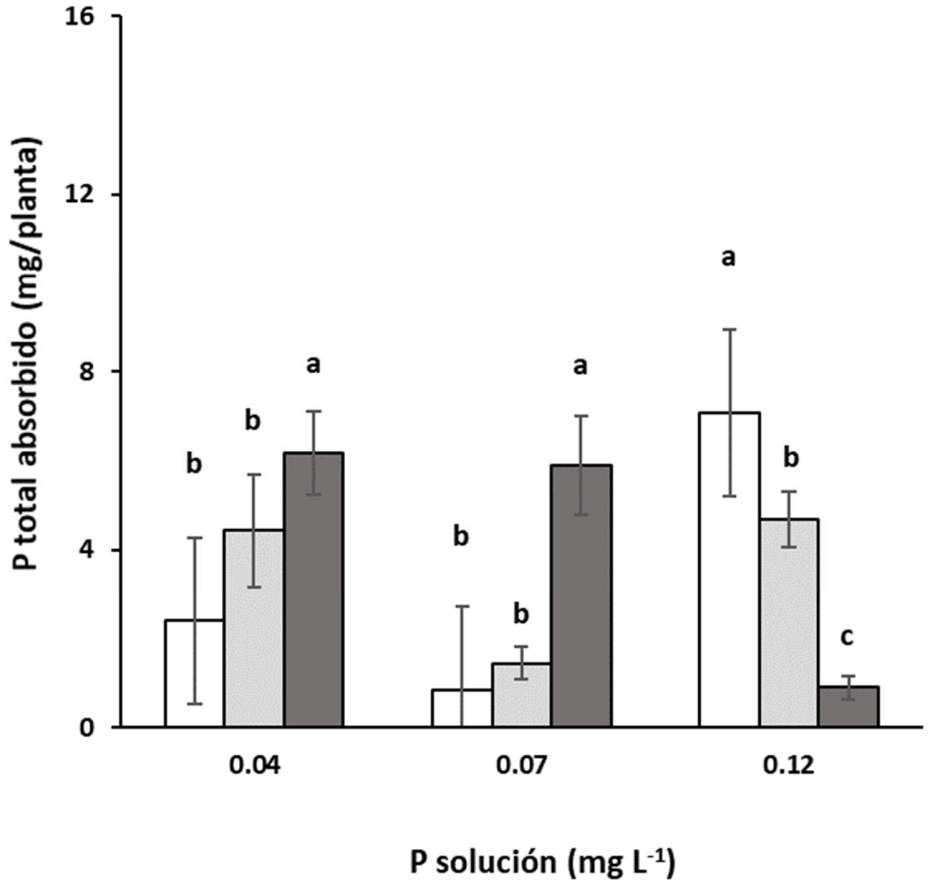


Figura 6-1. Masa seca aérea y contenido de P total absorbido en la parte aérea de plantas de café *C. arabica* cv. Tabi en función de la inoculación con dos hongos solubilizadores de fósforo (*P. ubiquetum* y *P. subserialis*), a tres niveles de P en el suelo de la unidad Timbío. Letras minúsculas no comunes indican diferencia significativa entre tratamientos mediante la prueba de Duncan (α= 0.05), para cada nivel de P en la solución del suelo. Barras verticales indican error estándar.

6.4.2 Comparación de la respuesta de plantas de café a la aplicación de P con fertilizante soluble, una fuente de P de baja solubilidad y la inoculación con el hongo *Phlebia subserialis* (cepa CH4).

La masa seca total y el contenido de P en las plantas de café cv. Tabi se afectó significativamente por los tratamientos (Figura 6-2 A). Las plantas testigo o control (no inoculadas, ni fertilizadas con P) presentaron una masa seca de 1.5 g/planta en promedio, mientras que con los tratamientos con P y con la inoculación con el hongo solubilizador de P la masa seca aumentó significativamente, hasta alcanzar valores medios que fluctuaron entre 5.0 y 5.7 g/planta, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí (α= 0.05). El incremento medio fue de 3.6 veces con respecto a las plantas testigo o control sin fertilizar o inocular.

El contenido de P absorbido en la parte aérea exhibió un comportamiento similar (Figura 6-2 B). Así, las plantas testigo o control (no inoculadas, ni fertilizadas con P) absorbieron en promedio 2.4 g de P/planta, y con los tres tratamientos el nivel del elemento aumentó significativamente hasta valores medios que fluctuaron entre 6.2 y 8.3 mg/planta, sin presentarse diferencia estadística entre ellos (α= 0.05), pero si de los tres tratamientos con respecto al testigo o control. De la misma manera que con la masa seca total, el P total absorbido con los diferentes tratamientos fue en promedio 3 veces superior al control.

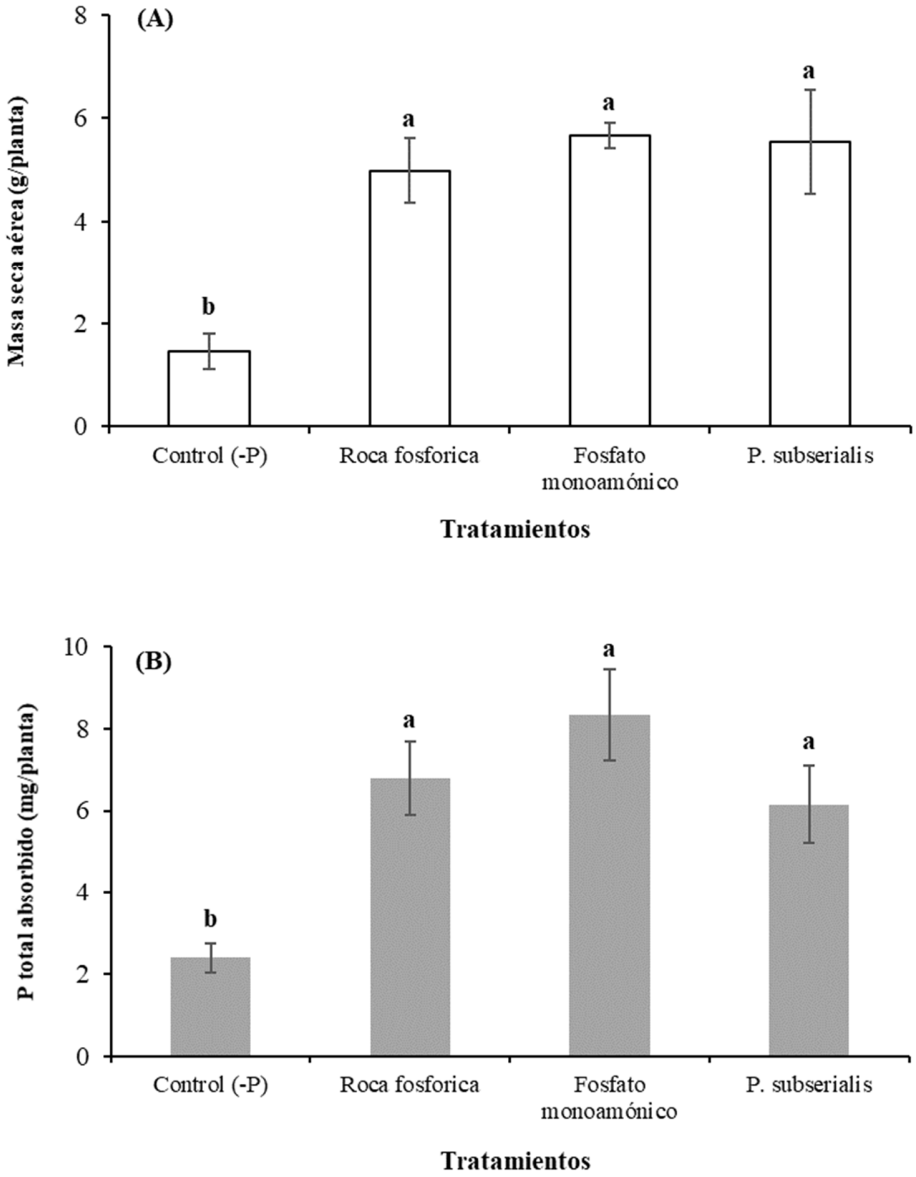


Figura 6-2 (A-B). Crecimiento de plantas de café cv. Tabi y absorción de P, efecto de la aplicación de P con fertilizante soluble, un fertilizante de baja solubilidad y la inoculación con el hongo solubilizador *P. subserialis-CH20*. Barras verticales indican error estándar. Letras no comunes representan diferencia estadística según prueba Duncan al 5%.

6.5 Discusión

La respuesta a la aplicación del *Phlebia subserialis* puede deberse a que los aniones orgánicos (AO) como el ácido láctico o su base conjugada que se demostró, es el único AO que produce este aislamiento de *Phlebia subserialis*-CH4 a partir de su metabolismo, y que puede competir por los sitios de adsorción electrostática que ocupa el P en el suelo, aspecto que se traduce en el incremento de la concentración de fosfatos en la solución (Lin *et al.,* 2017; Lazo *et al.,* 2017), potencializando el aprovechamiento del nutriente tanto por la planta como por el microorganismo. Sin embargo, debe existir una condición en el suelo específica para que el citado fenómeno sea favorable para ambos seres vivos (Adeleke *et al.,* 2016; Saravanakumar *et al.,* 2013).

Para explicar lo anterior, se ha demostrado que en un ambiente edáfico como el que se presenta en el suelo Andisol de Timbío, la alta fijación de P puede inducir a que las plantas que allí crecen, exuden a través de sus raíces sustancias carbonáceas (Wyciszkiewicz *et al.* 2016; Zhao *et al*., 2015; López *et al.,* 2014; Morgan *et al*., 2005), que aunque varían en composición y cantidad entre especies vegetales (Hammond and White, 2008), pueden servir entre otros, como sustrato para que algunos de estos hongos solubilizadores de fosfatos, a través de su metabolismos produzcan AO (Lazo *et al*., 2017). Estos aspectos en conjunto, dan cuenta de lo que puede denominarse un efecto de simbiosis planta-HSP para tolerar bajos niveles de P en el suelo.

Estas interacciones planta-HSF, requieren inversión en términos de energía por parte de ambos simbiontes. A nivel de planta, la translocación de sustancias carbonáceas a través de las raíces puede comprometer más de un 40% el C fijado por la fotosíntesis (Morgan *et al.,* 2005), en tanto que para el caso de los hongos, la generación del ácido láctico, depende de un alto consumo enzimático, el cual varía según la fuente de C del sustrato (Deng *et al.,* 2016).
Por lo mencionado, cuando el P soluble es demasiado bajo, la inversión energética de las plantas y los HSP necesaria para suplir sus requerimientos, podría llegar a comprometer el crecimiento de ambos organismos vivos, en especial de aquel que posee menos

biomasa (Illmer and Schiner, 1994), dado que una vez la fuente mineral de P es omitida el crecimiento de HSP cesa (Halvorson *et al.,* 1990). En contraposición, al existir una alta disponibilidad de P soluble en solución, la cual para este caso correspondió a un nivel superior de 0.07 mg L^{-1} (10 mg kg^{-1} Bray II), los HSP ganarían biomasa e incorporarían el P a su estructura (Khan *et al.,* 2010), generando un desabastecimiento de P en la solución, efecto que se explicaría una menor tasa de crecimiento de las plantas de café, fenómeno que se evidencia en el suelo de la unidad Timbío con las concentraciones mayores de P. De igual forma, Dijkstra *et al*., (2015) evidenciaron que plantas y microorganismos pueden estar compitiendo por el mismo P. El efecto de dicha competencia podría estar obedeciendo a variaciones en el contenido de humedad del suelo, dado que el contenido del agua aprovechable por las raíces y la concentración de P disuelto en ella, puede estar variando en el tiempo, de tal forma que uno u otro organismo se favorezca.

Con relación al efecto de la aplicación del hongo *Phlebia subserialis*-CH4 en el crecimiento de plantas de café en almácigo con relación a la recomendación de P con fuentes minerales solubles y de baja solubilidad, los resultados confirman la hipótesis acerca de la posibilidad de sustituir o más bien complementar la fertilización fosfórica actualmente recomendada cuando se utiliza el citado hongo en el suelo de la unidad Timbío como alternativa biotecnológica bajo las presentes condiciones experimentales, siempre y cuando se garantice un nivel máximo de 0.07 mg L^{-1} de P en solución, el cual equivale para este suelo a 10 mg kg^{-1} según la metodología Bray II. Este resultado debe validarse entonces en futuros estudios.

En concordancia con los resultados del capítulo 3 y los del primer experimento este capítulo, las variables asociadas con el crecimiento y el metabolismo (producción de AO) por parte de los HSP objetos de estudio en condiciones de laboratorio, pueden ser indicadores de la respuesta de *Phlebia subserialis*-CH4 en condiciones de vivero o almácigo. En este sentido, *P. subserialis*-CH4, se destacó por presentar la mayor tasa de crecimiento y por generar únicamente ácido láctico, aspectos que permiten establecer que aún en condiciones donde las fuentes de carbono son de fácil accesibilidad como ocurre en el medio de cultivo (glucosa 1 %), este hongo genera cantidades de un ácido mono

carboxílico cuya base conjugada (lactato) en justa cantidad pueden desorber el P fijado en el suelo que es requerido para su crecimiento.

Lo anterior estaría indicando que para el suelo de Timbío catalogado de alta fijación de P, cuyo índice de humificación de la materia orgánica (Tabla 6-1) genera limitaciones en la concentración de sustancias carbonáceas lábiles, *Phlebia subserialis*-CH4 puede ser el HSP indicado para continuar los estudios de estandarización y validación. Para ello, es necesario que en su formulación se incluya una fuente lábil de C, la cual para nuestro caso correspondió a glucosa al 10 %.

Con el fosfato monoamónico y la roca fosfórica, los resultados en crecimiento y absorción de P por las plantas, son indicador de su efectividad como fuentes de P. Esta condición sería evidente siempre y cuando se utilicen las dosis recomendadas, dado que, en condiciones de alta fijación de P como las de Timbío se necesitaría a través de su aplicación, saturar los puntos de fijación de fosfatos que tiene el suelo y una vez esto suceda, una proporción del elemento suministrado quede en forma aprovechable para las plantas.

Lo discutido permite suponer que la actual recomendación de P con fuentes minerales del nutriente podría hacerse de manera más eficiente en términos de la reducción de las dosis, siempre y cuando su recomendación se efectúe en con una alternativa biotecnológica como *P. subserialis*-CH4. Debe continuarse entonces con los estudios de estandarización y validación de esta recomendación.

En general, la literatura registra pocas experiencias que evalúen el efecto de los HSP en ambientes edáficos cuyos niveles de P y de C sean variables. En aspectos relacionados, el uso sustancias orgánicas carbonizadas (biochar), las cuales, dependiendo de su origen, pueden tener P en su composición química y/o presentan capacidad de adsorción del elemento (Zhang *et al.,* 2016; Dari *et al*., 2016), donde plantas inoculadas con hongos del género *Penicillium* han mejorado el crecimiento y la absorción de P en trigo; efecto que se atribuye a la producción de ácido cítrico por parte del microorganismos y a la eficiencia de su colonización en la zona de raíces del cultivo (Efthymiou *et al*., 2018). He *et al*. (2014),

registran efectos significativos en la solubilización de P desde el biochar, utilizando cepas bacterianas del género *Lysinibacillus* y parte del efecto lo atribuyen a la capacidad que tiene dicho material para segregar al medio sustancias carbonáceas de bajo peso molecular como alcoholes y grupos carbonilos, los cuales a bajas concentraciones sirven de fuente para el metabolismo de los citados solubilizadores de P.

Lo anteriormente discutido confirma que la mayor probabilidad de éxito en el uso de una propuesta biotecnológica con HSP, se obtienen en la medida de que conozcan los aspectos relacionados con el metabolismo de los HSP de interés, de los compuestos específicos que producen y las condiciones propias o características físicas y químicas del suelo al que van dirigidos para su mayor aprovechamiento.

6.6 Implicaciones de los resultados

- Las propuestas biológicas o biotecnológicas a base de hongos solubilizadores de P pueden ser efectivas en condiciones de laboratorio e incluso invernadero o vivero; no obstante, su aplicabilidad en el campo depende de las características propias del suelo a donde van dirigidas. Específicamente el uso de *Phlebia subserialis* aislamiento CH4 como alternativa de sustitución parcial o complemento de la fertilización fosfórica en plantas jóvenes de café depende de la concentración de P aprovechable, así como de la cantidad y grado de humificación de la materia orgánica del suelo, entre otros aspectos.

- Es preciso además considerar que desde el punto de vista metodológico deben hacerse ajustes y profundización en el estudio de rutas metabólicas alternas de los HSP objetos de estudio que permitan avanzar hacia una formulación a escala comercial.

- Es recomendable validar estos resultados en otros suelos de importancia para la caficultura colombiana, implementando las formulaciones sin tratamientos de estrilización del sustrato.

6.7 Bibliografía

Acharya, S. S., & Panigrahi, M. K. (2016). Evaluation of factors controlling the distribution of organic matter and phosphorus in the Eastern Arabian Shelf: A geostatistical reappraisal. *Continental Shelf Research*, *126*, 79-88.

Adeleke, R., Nwangburuka, C., & Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African Journal of Botany*, *108*, 393-406.

Almeida, D. S., Penn, C. J., & Rosolem, C. A. (2018). Assessment of phosphorus availability in soil cultivated with ruzigrass. *Geoderma*, *312*, 64-73.

Ávila, W. E., Sadeghian, S., Sánchez, P. M., & Castro, H. E. (2010). Respuesta del café al fósforo y abonos orgánicos en la etapa de almácigo. Cenicafé 6 (4), 358-369.

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, *19* (2), 292-305.

Cuervo, C. J. (2017). Dependencia micorrizal de variedades de café bajo diferentes concentraciones de fosfato soluble en el suelo. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Maestría en Geomorfología y Suelos. (Tesis de M.Sc). Medellín (Colombia). 92p.

Dari, B., Nair, V. D., Harris, W. G., Nair, P. K. R., Sollenberger, L., & Mylavarapu, R. (2016). Relative influence of soil-vs. biochar properties on soil phosphorus retention. *Geoderma*, *280*, 82-87.

de la Luz Mora, M., Demanet, R., Acuña, J. J., Viscardi, S., Jorquera, M., Rengel, Z., & Durán, P. (2017). Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure. *Applied Soil Ecology*, *115*, 19-26.

Deng, W., Wang, Y., & Yan, N. (2016). Production of organic acids from biomass resources. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, *2*, 54-58.

Díiaz, C., Sadeghian, S., & Morales, C. S. (2009). Cambios químicos ocasionados por encalamiento y uso de lombrinaza en la etapa de almácigo del café. Cenicafé, 59 (4), 295-309.

Dijkstra, F. A., He, M., Johansen, M. P., Harrison, J. J., & Keitel, C. (2015). Plant and microbial uptake of nitrogen and phosphorus affected by drought using 15 N and 32 P tracers. *Soil Biology and Biochemistry*, *82*, 135-142.

Efthymiou, A., Grønlund, M., Müller-Stöver, D. S., & Jakobsen, I. (2018). Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected Penicillium strains. *Soil Biology and Biochemistry*, *116*, 139-147.

Fox, R. L., & Kamprath, E. J. (1970). Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. *Soil Science Society of America Journal*, *34* (6), 902-907.

Gaitán B. A.L., Rivillas O., C.A.; Salazar G., L.F. Manejo integrado de almácigos. En: Cenicafe. Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura. Chinchiná: FNC: CENICAFE, 3 vols.

Habte, M., & Bittenbender, H. C. (1999). Reactions of coffee to soil solution P concentration and arbuscular mycorrhizal colonization. *Journal of South Pacific Agriculture*, *6*, 29-34.

Halvorson, H. O., Keynan, A., & Kornberg, H. L. (1990). Utilization of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biology and Biochemistry*, *22* (7), 887-890.

Hammond, J. P., & White, P. J. (2008). Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of experimental botany*, *59* (1), 93-109.

He, H., Qian, T. T., Liu, W. J., Jiang, H., & Yu, H. Q. (2014). Biological and chemical phosphorus solubilization from pyrolytical biochar in aqueous solution. *Chemosphere*, *113*, 175-181.

Illmer, P., & Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, *27* (3), 257-263.

Jaramillo, S., & Osorio, N. W. (2009). Mycorrhizal dependency of coffee seedlings at three levels of soil solution phosphorus. *Suelos Ecuatoriales*, *39* (1), 143-147.

Jiang, L. G., Liang, B., Xue, Q., & Yin, C. W. (2016). Characterization of phosphorus leaching from phosphate waste rock in the Xiangxi River watershed, Three Gorges Reservoir, China. *Chemosphere*, *150*, 130-138.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *56* (1), 73-98.

Koppelaar, R. H. E. M., & Weikard, H. P. (2013). Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options. *Global Environmental Change*, *23* (6), 1454-1466.

Lazo, D. E., Dyer, L. G., & Alorro, R. D. (2017). Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. *Minerals Engineering*, *100*, 115-123.

Lin, B., Hua, M., Zhang, Y., Zhang, W., Lv, L., & Pan, B. (2017). Effects of organic acids of different molecular size on phosphate removal by HZO-201 nanocomposite. *Chemosphere*, *166*, 422-430.

López, A. (1960). M. Valoración de las formas de fósforo, orgánico e inorgánico, de un suelo de la zona cafetera Colombiana. *Cenicafé*, *11* (7), 189-204.

Lopez-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annual review of plant biology*, *65*, 95-123.

Minten, B., Dereje, M., Engida, E., & Kuma, T. (2017). Coffee value chains on the move: Evidence in Ethiopia. *Food Policy*. Papper 66. . https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2017.07.012. In press

Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, *56* (417), 1729-1739.

Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphrous acquisition. *Applied Soil Ecology*, *86*, 41-54.

Rendon, J., Garcia, J., Gonzalez, H., & Ramirez, J. (2015). Análisis técnico económico del proceso de lombricultura en pulpa de café para la producción de abono orgánico. Cenicafé, 66 (2), 7-16DOI 10.13140/RG.2.1.2766.3120

Roy, E. D., Willig, E., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Vazquez, F. F., Pegorini, L., & Porder, S. (2017). Soil phosphorus sorption capacity after three decades of intensive fertilization in Mato Grosso, Brazil. Agriculture, Ecosystems & Environment, 249, 206-214.

Sadeghian, S. (2008). *Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia: Guía Práctica*. Boletín Técnico Cenicafe, (32,) 43p.

Salazar A., J,N. (1983). La pulpa de café como abono para almácigos y plantaciones de café. Suelos Ecuatoriales (Colombia) 13 (1):147-151.

Salazar, A. (1992). La pulpa de café transformada por la lombriz es un buen abono para almácigos de café. *Avances Técnicos Ceiniacafé*, *178,* (1-2p).

Sanders, I.R.; Croll, D. (2010). Arbuscular Mycorrhiza: The Challenge to understand the Genetics of the Fungal Partner. Annual of Review of Genetic, 44 271-292.

Saravanakumar, K., Arasu, V. S., & Kathiresan, K. (2013). Effect of Trichoderma on soil phosphate solubilization and growth improvement of Avicennia marina. *Aquatic botany*, *104*, 101-105.

Tian, J., Boitt, G., Black, A., Wakelin, S., Condron, L. M., & Chen, L. (2017). Accumulation and distribution of phosphorus in the soil profile under fertilized grazed pasture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *239*, 228-235.

Wang, N., Jassogne, L., van Asten, P. J. A., Mukasa, D., Wanyama, I., Kagezi, G., & Giller, K. E. (2015). Evaluating coffee yield gaps and important biotic, abiotic, and management factors limiting coffee production in Uganda. *European Journal of Agronomy*, *63*, 1-11.

Wyciszkiewicz, M., Saeid, A., Dobrowolska-Iwanek, J., & Chojnacka, K. (2016). Utilization of microorganisms in the solubilization of low-quality phosphorus raw material. *Ecological Engineering*, *89*, 109-113.

Zhang, H., Chen, C., Gray, E. M., Boyd, S. E., Yang, H., & Zhang, D. (2016). Roles of biochar in improving phosphorus availability in soils: A phosphate adsorbent and a source of available phosphorus. *Geoderma*, *276*, 1-6.

Zhao, L.; Zhang, Y. Q. (2015). Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of Trichoderma asperellum Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, *14* (8), 1588-1597.

Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of The Total Environment*, *612*, 522-537.

Zhu, X., Z.; Song, F., B.; Zhu, H W. (2010). Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. Plant Soil 331:129–137

7. Conclusiones y Recomendaciones

- El potencial de fijación de fósforo en los suelos fue explicado en función de los contenidos de materia orgánica, el porcentaje de arenas y el nivel de aluminio intercambiable.

- Es posible efectuar recomendaciones de fertilización fosfórica en café a partir de la evaluación de capacidad de fijación de P que tenga el suelo, dado que se demostró la estrecha relación entre esta técnica y la metodología Bray II.

- Se encontró que los suelos con mayor capacidad de fijación de fosfatos, contenidos y nivel de humificación de la materia prgánica, presenatron mayor abundancia relativa de hongos con apacidad de solubilizar fosfatos en condiciones de laboratorio. El pH, la concentración y diversidad de AO generados por los HSP en condiciones de laboratorio, explicaron el poder de solubilización de P a partir de las RP y pueden considerarse variables indicadoras para efectuar formulaciones dirigidas a condiciones de campo.

- La efectividad de los microorganismos evaluados, tanto el hongo micorrizal *Rizoglomus fasciculatum* como el hongo solubilizador de fosfatos *Phlebia subserialis* (cepa CH4), para promover el crecimiento y la absorción de fósforo en plantas de almácigo de café (*Coffea arabica*), dependió del nivel de fósforo soluble del suelo, siendo también dependiende de la especie de hongo, bajo las condiciones del estudio.

- Se demostró que a través de la inoculación con el hongo *Phlebia subserialis* (cepa CH4) puede sustituir o complementar la fertilización fosfórica soluble o roca fosfórica recomendada para café en su fase de planta joven (almácigo), dependiendo del tipo de las condiciones del suelo utilizado y del nivel de P en la solución, bajo las condiciones experimentales utilizadas.

- Efectuar la validación de los resultados en otros suelos de importancia para la caficultura Colombiana y monitoreando el P en solución.

- Estimar la posibilidad de evaluar otras cepas HSP y HMA, aplicándolos de manera individual o en consorcio, en sustratos sin ningún tipo de tratamiento de esterilización.

- Establecer evaluaciones permanentes de “chequeo” de la efectividad de los HSP y HMA, con el fin de hacer seguimiento a la calidad de los inóculos formulados.