

Alternativas Microbiológicas para Mejorar el Crecimiento del Cauquí

Microbiological Alternatives for the Improvement of Cowpea Growth

Joaquín Guillermo Ramírez Gil¹; Laura Osorno Bedoya²;
Nelson Walter Osorio Vega³ y Juan Gonzalo Morales Osorio⁴

Resumen. La baja disponibilidad de fósforo (P) en el suelo, la ineficiencia que presenta su absorción y el costo de la fertilización fosfórica son limitantes para la productividad agrícola. Una alternativa biotecnológica para manejar este problema es mediante el uso de microorganismos del suelo, capaces de mejorar la disponibilidad y la absorción de P y la eficiencia de la fertilización con fertilizantes más económicos como la Roca Fosfórica (RP). En este trabajo se evaluó bajo condiciones de casa de malla, el efecto de un hongo micorrízico arbuscular (HMA) (*Glomus fasciculatum*) y un microorganismo solubilizador de P (MSP) (*Mortierella* sp.) sobre la toma de P y el crecimiento de plantas de cauquí (*Vigna unguiculata* L. Walp.), con adición de tres niveles de RP (0, 100 y 300 mg de P kg⁻¹ suelo). Los resultados mostraron un incremento significativo ($P < 0,05$), de la biomasa seca, diámetro medio y altura de la planta y P foliar, para las plantas inoculadas con HMA, comparado con las no inoculadas. La adición de RP y la inoculación con MSP, no tuvo un efecto estadísticamente significativo ($P > 0,05$) sobre las variables de crecimiento evaluadas. Sin embargo, en todos los tratamientos en donde se aplicó el MSP, se incrementó significativamente el P soluble. Con base en lo encontrado en este trabajo, se puede plantear que el hongo micorrízico arbuscular evaluado (HMA), mejora la eficiencia de absorción de P y el crecimiento del cauquí bajo las condiciones evaluadas.

Palabras clave: *Glomus fasciculatum*; *Mortierella* sp.; *Vigna unguiculata*; microorganismos.

Abstract. The low phosphorus (P) availability in soil, absorption inefficiency and high costs of phosphate fertilization are limiting factors for agricultural productivity. A biotechnological alternative is the use of soil microorganisms, capable of improving P availability, absorption and the use of fertilizer cheaper as rock phosphate fertilization (PR). This experiment was performed under screen house conditions aiming to evaluate the effect of an arbuscular-mycorrhizal fungus (HMA) (*Glomus fasciculatum*) and a P solubilizing fungus (MSP) (*Mortierella* sp.) on P uptake and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) growth, planted with three concentrations (0, 100 and 300 mg of P per each kg of soil) of PR. A significant increase ($P \leq 0,05$) in dry mass, plant height, mean stem diameter and foliar phosphorus, was observed in the HMA-inoculated plants compared with the HMA-non inoculated plants. No significant differences were identified when PR was added or MSP was inoculated. The results suggest that the use of HMA may improve P absorption and cowpea growth under the evaluated conditions.

Key words: *Glomus fasciculatum*; *Mortierella* sp.; *Vigna unguiculata*; microorganisms.

Los suelos tropicales presentan bajos niveles de nutrientes, especialmente de fósforo (P), lo que condiciona la productividad de los cultivos (Wakelin *et al.*, 2004) debido a que es un nutriente indispensable para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Randhawa *et al.*, 2006; Osorio, 2011). Esta deficiencia ha generado la utilización continua de fertilizantes fosfóricos solubles, ocasionando fenómenos de fijación, lixiviación y precipitación del P en el suelo, los cuales acarrearán una baja eficiencia en la nutrición, contaminación ambiental y altos costos de producción de los cultivos (Osorio, 2011).

Para incrementar la eficiencia de la fertilización con P en el trópico se han evaluado diferentes estrategias, como el uso de distintas fuentes del nutriente, el tiempo, el método de aplicación y la combinación con enmiendas minerales y otros fertilizantes, entre otros; sin embargo, la eficiencia de la fertilización con P todavía es muy baja (5-10%) (Osorio, 2007).

Una alternativa que podría ser técnica y económicamente viable, para incrementar la solubilidad del P en el suelo y mejorar su absorción por

Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agrarias - Departamento de Ciencias Agronómicas. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <jgramireg@unal.edu.co>

² Ingeniera Biológica. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias - Escuela de Biociencias. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <lauraosornobedoya@gmail.com>

³ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias - Escuela de Biociencias. A.A. 3840. Medellín, Colombia. <nwosorio@unal.edu.co>

⁴ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agrarias - Departamento de Ciencias Agronómicas. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <jgmosaleso@unal.edu.co>

Recibido: Marzo 20 de 2013; aceptado: Junio 25 de 2013.

las plantas, es el uso de algunos microorganismos solos o combinados con roca fosfórica (RP) como fuente de P (Shrivastava *et al.*, 2007; Osorio, 2011). Los hongos micorrízico arbuscular como *Glomus fasciculatum* (HMA) y microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP), como *Mortierella* spp., son frecuentemente citados en la literatura para mejorar la eficiencia de la fertilización fosfórica y aumentar la solubilidad de este en el suelo (Whitelaw, 1999; Osorio y Habte, 2001; Osorio 2011). La relación simbiótica entre la planta y el HMA, se presenta debido a que la planta mediante los exudados radicales le suministra una fuente de energía al hongo, el cual aumenta la superficie de exploración del sistema de raíces, mejorando la absorción de nutrientes en especial el P (Hause y Fester, 2005). Por otro lado, el proceso de solubilización del P por MSP, obedece a que la producción de ácidos orgánicos y la liberación de protones hacia la solución del suelo por parte del microorganismo implicado que permite solubilizar fuentes de P insolubles como es el caso de la RP (Singh y Reddy, 2011; Osorio, 2011).

El caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) es una leguminosa cultivada en regiones de África, Asia y América, ha sido utilizada ampliamente en la alimentación humana y animal, gracias a los altos contenidos proteicos que posee y a su amplia capacidad de adaptación a condiciones de sequía y baja fertilidad de los suelos (Ehlers y Hall, 1997; Kongpun *et al.*, 2011). Las investigaciones indican que estas características se

deben en gran parte a la simbiosis benéfica con hongos formadores de micorriza, los cuales incrementan la toma de nutrientes, la absorción del agua y la resistencia a condiciones de estrés (Rajapakse *et al.*, 1989; Dialloa *et al.*, 2001; Kongpun *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una cepa de *G. fasciculatum* y una de *Mortierella* sp., sobre la absorción de P y parámetros de crecimiento de plantas de *V. unguiculata* fertilizadas con tres niveles de RP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología del Suelo y casa de malla de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín (6°15N, 75°35'W, 1.495 msnm).

Sustrato. Se preparó un sustrato en una relación 3:1:1 de suelo, cascarilla de arroz y cuarzo respectivamente, con el fin de mejorar algunas propiedades físicas. El suelo que se utilizó fue un Oxisol pH 4,8, proveniente del centro experimental Carimagua de CORPOICA, Vichada-Colombia (Tabla 1). Para mejorar las condiciones de desarrollo del trabajo, el pH del suelo fue ajustado a 5,6 con la adición de CaO, previa curva de incubación de cal. El sustrato de crecimiento se esterilizó dos veces en autoclave a 120 °C y 0,15 MPa durante 1 hora, con un período de 24 h entre cada esterilización. Cada planta se sembró en una maceta con 1.500 g de sustrato (base seca).

Tabla 1. Características del suelo empleado para la evaluación de alternativas microbiológicas para mejorar el crecimiento del caupí

Arena %	Limo %	Arcilla %	Materia orgánica %	Al	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Cu	Zn	B	S	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	P (Bray II)	P soluble
				cmol _c kg ⁻¹				mg kg ⁻¹									
42	36	34	6	0,4	2,2	0,9	0,3	37	3	1	2	0,1	89	46	43	24	0,022

Textura (Bouyoucos); pH (agua, 1:2, V:V); Al (KCl 1 M); Ca, Mg, y K (acetato de amonio 1 M); Fe, Mn, Cu, y Zn (Olsen-EDTA); B (agua caliente); S (Fosfato de calcio 0,008 M); NO₃ (Sulfato de aluminio 0,025 M); NH₄⁺ (KCl 1M); P (Bray II); P soluble (0,01 M de CaCl₂); contenido de materia orgánica (Walkley y Black). Análisis desarrollado en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín.

Microorganismos utilizados en la inoculación del suelo. Las cepas de microorganismos utilizadas en este trabajo, se obtuvieron de la colección general del laboratorio de microbiología del suelo de la Universidad Nacional de Colombia - sede Medellín. *G. fasciculatum* fue originalmente proporcionado por el Doctor M. Habte de la Universidad de Hawaii (Honolulu, EUA) y posteriormente multiplicado en raíces de sorgo y kudzú. El hongo *Mortierella* sp. fue originalmente aislado en la Universidad de Hawaii a

partir de un Andisol (Osorio y Habte, 2001). El sustrato se inoculó con 35 g kg⁻¹ de inóculo crudo de *G. fasciculatum*, que contenía 47 propágulos infectivos g⁻¹ (Porter, 1979). Para el control con sustrato no inoculado se utilizaron 35 g kg⁻¹ de inóculo crudo esterilizado (0,15 MPa, 120 °C por 60 min), al cual se le adicionaron 10 mL del filtrado (10 µm) de una suspensión al 10% de la fuente de inóculo original. El hongo *Mortierella* sp., se multiplicó en medio PDA (5 días a 25 °C). El micelio obtenido se mezcló de manera

homogénea con agua destilada estéril, la solución se ajustó a una concentración de 7×10^6 (UFC) mL^{-1} , y se adicionaron 5 mL en el sitio de siembra por cada unidad experimental. Para los controles se adicionó la misma solución esterilizada en autoclave (0,15 MPa, 120 °C por 60 min).

Fuente de fósforo evaluada. Se evaluaron tres niveles diferentes de RP (26% P_2O_5): 0, 100 y 300 mg kg^{-1} de P, pasada previamente por un tamiz de 250 μm .

Material vegetal. La especie que se utilizó para este experimento fue el caupí, la cual ha sido reportada como una planta altamente dependiente de la asociación micorrízica (Rajapakse *et al.*, 1989). Las semillas se pre-germinaron por 24 horas en cámara húmeda en condiciones a temperatura ambiente y se sembraron tres por pote. A las tres semanas se seleccionó una plántula por pote (dejando los potes homogéneos en tamaño), estas se mantuvieron en casa de malla durante dos meses, fertilizadas con solución nutritiva Hoagland libre de P y en condiciones de 30 - 40% de máxima capacidad de retención de humedad del sustrato.

Variables analizadas. Al final del experimento (2 meses después), se tomaron las siguientes variables respuesta para cada tratamiento: altura de la planta (cm), diámetro medio del tallo (mm), masa seca (60 °C por 72 h), área foliar y P foliar mediante muestreo no destructivo (Aziz y Habte, 1987) y determinación cuantitativa en laboratorio por el método de azul de molibdato (Murphy y Riley, 1962).

Se determinó la colonización micorrízica por decoloración de las raíces con KOH (10%) por 24 h (Phillips y Hayman, 1970), tinción con fuscina ácida (0,15%) (Kormanik *et al.*, 1980) y cuantificación mediante las líneas de intercepción (Giovanetti y Mosse, 1980). A partir de muestras tomadas del suelo se realizó el re-aislamiento de *Mortierella* sp. y la medición de fósforo soluble (0,01 M de CaCl_2).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de 3×2 con 3 repeticiones, el cual consiste en la adición de 0, 100 y 300 mg de P kg^{-1} sustrato, usando RP como fuente de P y la inoculación o no con *G. fasciculatum* y *Mortierella* sp., en forma individual o combinada. Se analizó la homocedasticidad y la normalidad de los datos ($P < 0,05$), utilizando los criterios de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente; posteriormente, se sometieron a

análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colonización micorrízica y fósforo foliar. Las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* (M+S-), presentaron un valor de colonización micorrízica promedio de 17,6%, el cual no presentó diferencia significativa con la adición del MSP (Figura 1A). En el tratamiento sin aplicación de RP se encontró el mayor porcentaje de colonización micorrízica. Los diferentes niveles evaluados de RP, no incidieron sobre el parámetro de colonización micorrízica (Figura 1B). Como se esperaba, en los controles no inoculados con micorrizas HMA (M-S-, M-S+), no se observó colonización ($P < 0,05$) (Figura 1A).

El porcentaje de colonización micorrízica de las plantas de caupí, encontrado en este trabajo se considera medio para esta especie (Rajapakse *et al.*, 1989); sin embargo, se observaron efectos positivos en los parámetros de crecimiento de la planta. Se han estudiado varios aspectos que afectan el porcentaje de colonización micorrízica, como la eficiencia de la cepa utilizada, el suministro de agua, el pH, la cantidad de P en solución y el porcentaje de materia orgánica entre otros (Osorio, 2011). Se ha observado que la aplicación de P en el suelo puede disminuir el porcentaje de colonización micorrízica de las plantas de caupí (Saidou *et al.*, 2012). Estos hallazgos han sido confirmados por Kongpun *et al.* (2011) quienes observaron alta colonización micorrízica en caupí y efectos positivos sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo del frijol, en suelos ácidos (pH 5) con bajos niveles de P. Resultados reportados por Ngwene *et al.* (2010), sugieren que la disponibilidad de P proveniente de la RP, está relacionada con un mayor suministro de NH_4^+ , relativo a NO_3^- ; sin embargo, esta relación afecta negativamente el porcentaje de colonización micorrízica.

El caupí está adaptado a zonas marginales, con suelos de muy baja fertilidad, degradados y muy secos (Edwards *et al.*, 1981; Ehlers y Hall, 1997). En áreas con las características anteriormente descritas, Rajapakse *et al.* (1989) encontraron valores promedios de 80% de colonización micorrízica. Se conoce que el grado de asociación micorrízica en caupí, disminuye drásticamente, cuando los niveles de P en el suelo son >30 ppm. Por lo tanto, el contenido de P en el suelo, es una de las variables que más influencia tiene

sobre la relación simbiótica del HMA en esta especie (Rajapakse *et al.*, 1989). En este trabajo se utilizó un oxisol con 24 mg kg⁻¹ de P (Bray II) y 0,022 mg kg⁻¹

de P soluble y 6% de materia orgánica (Tabla 1), lo cual pudo haber incidido en el grado de colonización media observado.

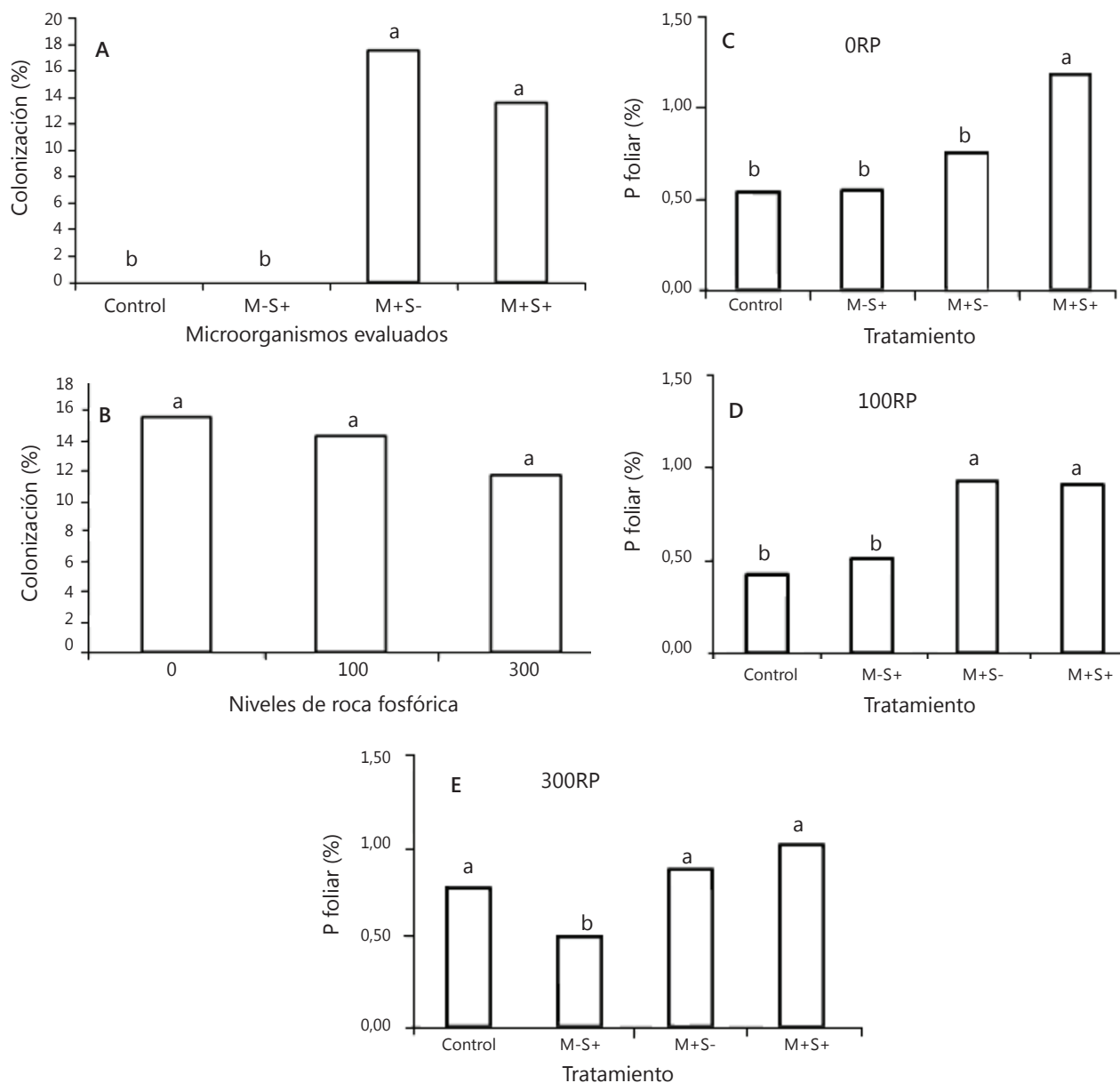


Figura 1. Colonización micorrízica y contenido de P foliar en plantas de caupí sometidas a diferentes tratamientos de microorganismos y RP. Porcentaje de colonización micorrízica en caupí (A); efecto de diferentes niveles de RP sobre la colonización micorrízica en caupí (B); contenido de P foliar (%) en plantas de caupí fertilizadas con 0 mg (C), 100 mg (D) y 300 mg (E) de P kg⁻¹ suelo, de RP. Control: plantas sin HMA y sin MSP, M- (sin HMA), M+ (con HMA), S- (sin MSP) y S+ (con MSP). Cada columna representa el promedio de cuatro datos. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P≤0,05).

El mayor valor de P foliar, se observó ($P < 0,05$) en el tratamiento sin presencia de RP (0 mg de P kg⁻¹suelo) e inoculado con el HMA y el MSP (M+S+) (Figura 1C). Una hipótesis para explicar este resultado, es que el suelo original posee niveles de P, pero no disponibles para la planta; sin embargo, el MSP podría hacerlo disponible por medio de desorción-disolución (Osorio y Habte, 2013), seguido de absorción por el HMA. Para los dos niveles restantes de RP (100 y 300 mg de P kg⁻¹ suelo), los valores más altos de P foliar ($P < 0,05$), se presentaron en los tratamientos donde se realizó la inoculación individual del HMA o en combinación con el MSP (M+S- y M+S+) (Figuras 1D

y E). Los niveles de P foliar observados en este trabajo indican que la cepa de micorriza usada, incrementa la absorción de P por la planta sin la adición de RP, lo que podría representar ahorro en costos de fertilizantes. Es necesario evaluar esta cepa en suelos con niveles bajos de P, en donde se podría identificar el efecto económico de disminución de aplicación de fertilizantes.

Variables biométricas. En las plantas inoculadas con el HMA, (M+S-), se observó un incremento significativo ($P < 0,05$) en la biomasa seca (69%), el área foliar (47%), la altura (44%) y el diámetro medio

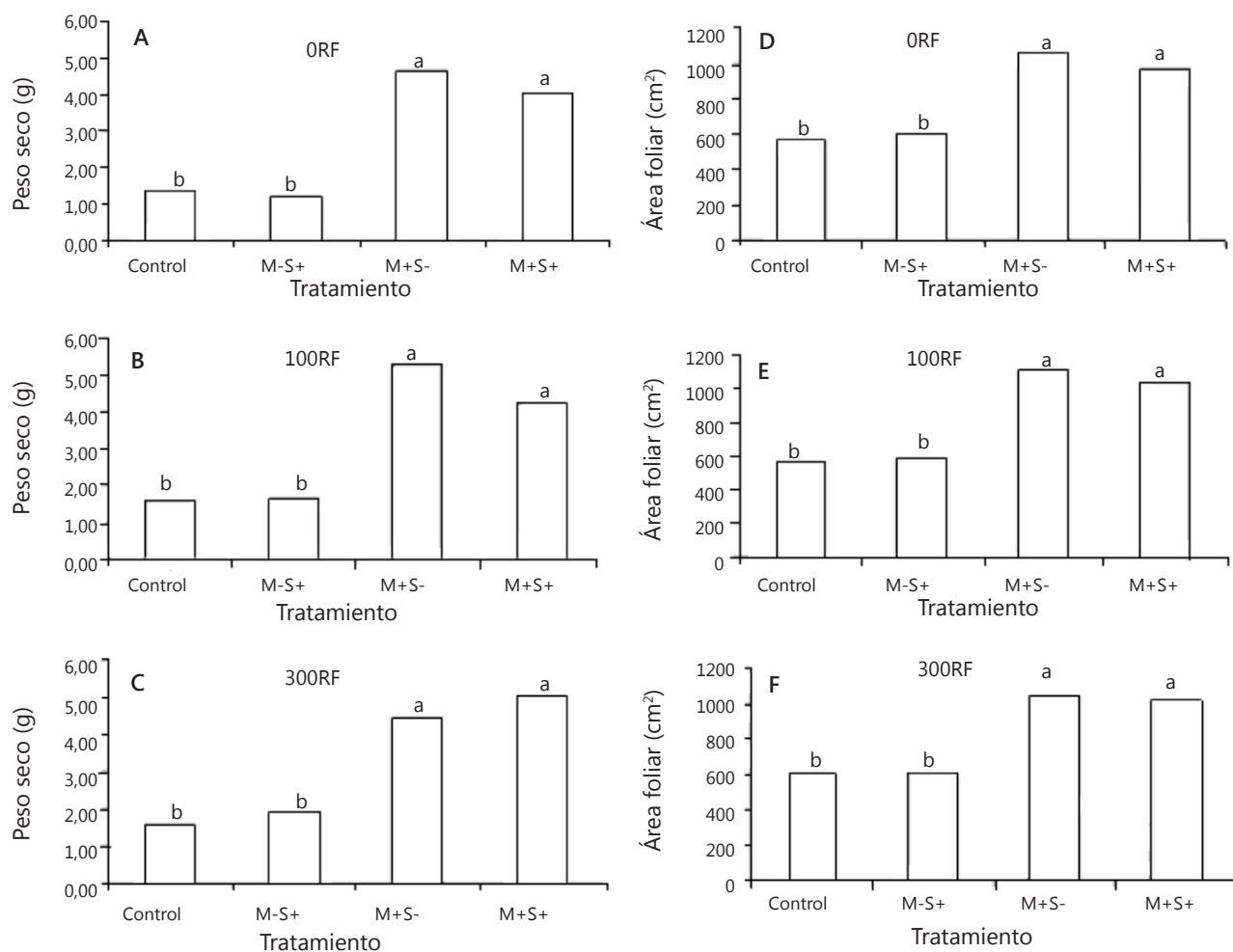


Figura 2. Peso seco (g) y área foliar (cm²) de plantas de caupí sometidas a diferentes tratamientos de microorganismos y P proveniente de RP. Peso seco (g) en plantas de caupí fertilizadas con 0 mg (A), 100 mg (B) y 300 mg (C) de P kg⁻¹ suelo de RP; área foliar (cm²) en plantas de caupí fertilizadas con 0 mg (D), 100 mg (E) y 300 mg (F) de P kg⁻¹ suelo de RP. Control: plantas sin HMA y sin MSP, M- (sin HMA), M+ (con HMA), S- (sin MSP) y S+ (con MSP). Cada columna representa el promedio de cuatro datos. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

del tallo (41%), en comparación con las plantas donde no se realizó inoculación del HMA (M-S- y M-S+), independientemente del nivel de la dosis de RP aplicada (M-S-, para 0, 100 y 300 mg de P kg⁻¹ suelo) (Figuras 2 y 3). Las plantas inoculadas simultáneamente con el HMA y el MSP (M+S+), mostraron resultados similares a

las plantas inoculadas únicamente con el HMA (Figuras 2, 3 y 5). Estos resultados confirman el efecto positivo reportado de la inoculación de caupí con micorrizas en general (Yaseen *et al.*, 2011) y en particular con *G. fasciculatum* (Rajapakse, *et al.*, 1989; Diallo *et al.*, 2001; Kongpun *et al.*, 2011).

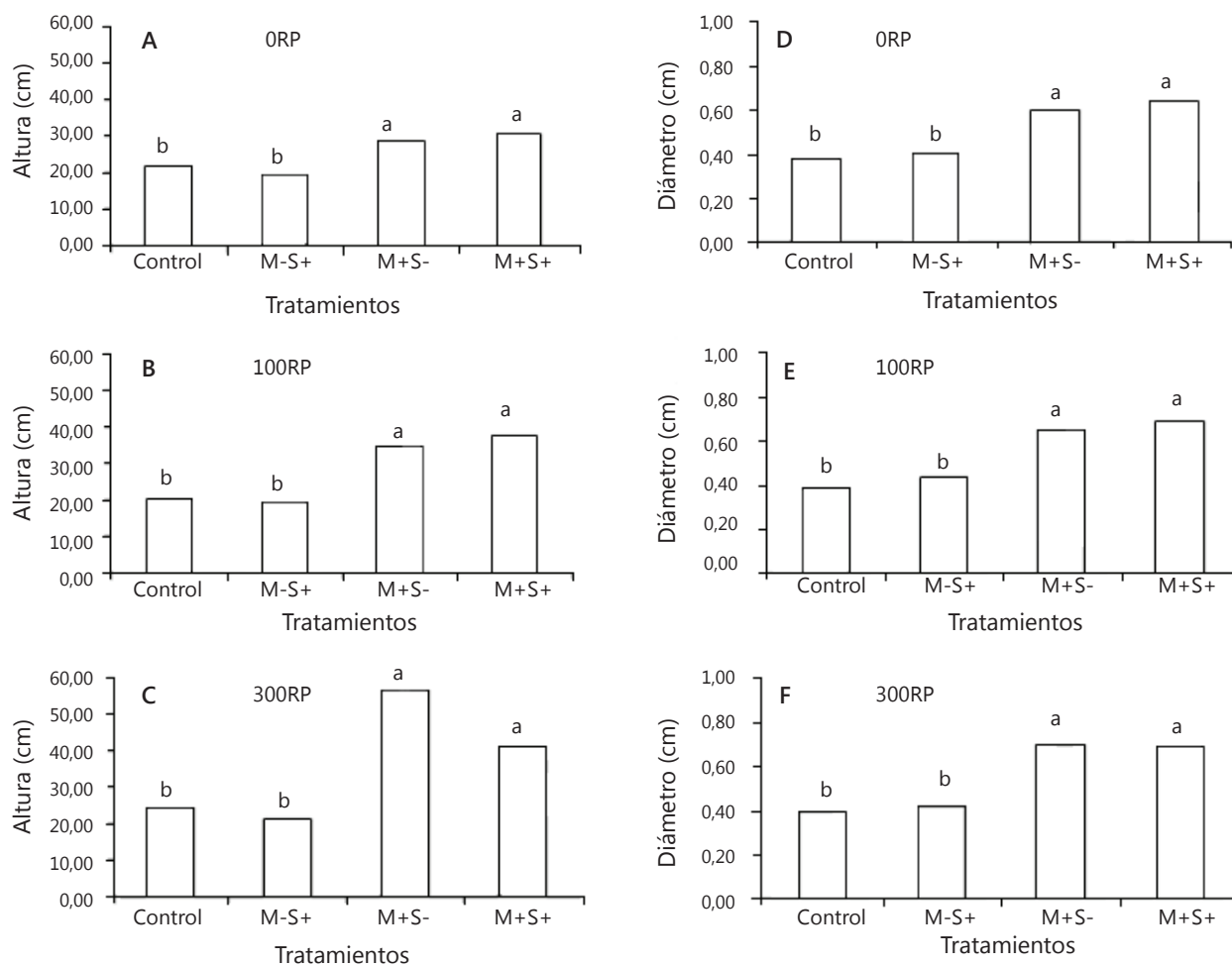


Figura 3. Altura (cm) y diámetro (cm) de plantas de caupí sometidas a diferentes tratamientos de microorganismo y niveles de aplicación de RP. Altura (cm) de plantas de caupí fertilizadas con 0 mg (A), 100 mg (B) y 300 mg (C) de P kg⁻¹ suelo de RP; diámetro del tallo (cm) de plantas de caupí fertilizadas con 0 mg (D), 100 mg (E) y 300 mg (F) de P kg⁻¹ suelo de RP. Control: plantas sin HMA y sin MSP, M- (sin HMA), M+ (con HMA), S- (sin MSP) y S+ (con MSP). Cada columna representa el promedio de cuatro datos. Columnas con las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa de los tratamientos según la prueba de Duncan (P ≤ 0,05).

El efecto benéfico reportado sobre la asociación del caupí con el HMA, se ha explicado principalmente por la mejora en la absorción de P y otros nutrientes (Diallo *et al.*, 2001). Autores como Kongpun *et al.* (2011), plantean que la asociación micorrizica es necesaria y quizás más importante que la fijación

biológica de nitrógeno, llevada a cabo con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Además de la mejora en la nutrición de las plantas, los HMA contribuyen significativamente a mejorar la estructura del suelo, incrementan la resistencia de la planta al estrés biótico y abiótico y favorece el establecimiento

de interacciones con otros microorganismos benéficos (Mansfeld *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2004; Boby *et al.*, 2008). Además, dentro de los cambios que ocurren cuando se da esta simbiosis está el aumento del potencial hídrico de las hojas y mantenimiento de la transpiración, proceso que se da gracias al incremento de la longitud y desarrollo de las raíces, confiriéndole a la planta una mayor área de exploración tanto en longitud como en profundidad (Davies *et al.*, 1992; Hoeksema *et al.*, 2010).

La adición de RP (100-300 mg de P kg⁻¹ suelo), no mejoró el desarrollo del caupí en este trabajo, lo cual aparentemente contrasta con lo encontrado por Akande *et al.* (2011), quienes registran un aumento entre el 20 y 35%, en los rendimientos de esta especie cuando se utilizó como la RP como fuente de P. Las diferencias encontradas en los dos trabajos podrían deberse a múltiples factores como, el contraste entre los suelos usados, ya que la dinámica del P puede ser diferente, al poco tiempo de duración del experimento, ya que

por su naturaleza, la RP no parece ser muy efectiva en ciclos cortos y al nivel inicial de P y otros nutrientes en el suelo, entre otros factores, puesto que el mayor efecto se ha observado en suelos con bajos niveles de P (Chien y Hammond, 1978; Osorio, 2011). Debido a la inhibición de la colonización micorrízica, en suelos con alto contenido de P y a la lenta liberación de P desde la RP, la mayor utilidad de la aplicación de RP y cepas de microorganismos, quizás sea en suelos con bajos niveles de nutrientes y en donde se ha aplicado la RP con suficiente antelación para que el P sea liberado y tomado efectivamente por la planta.

Efecto de *Mortierella* sp. Los mayores niveles de P soluble en el suelo, comparado con los niveles iniciales se registraron en todos los tratamientos donde se inoculó el MSP (M-S+ y M+S+) y sin presentarse interacción con las diferentes dosis de roca fosfórica aplicadas al suelo ($P > 0,05$). En todos los tratamientos en donde se inoculó el MSP, se logró re-aislar *Mortierella* sp. (Figura 4A y 4B).

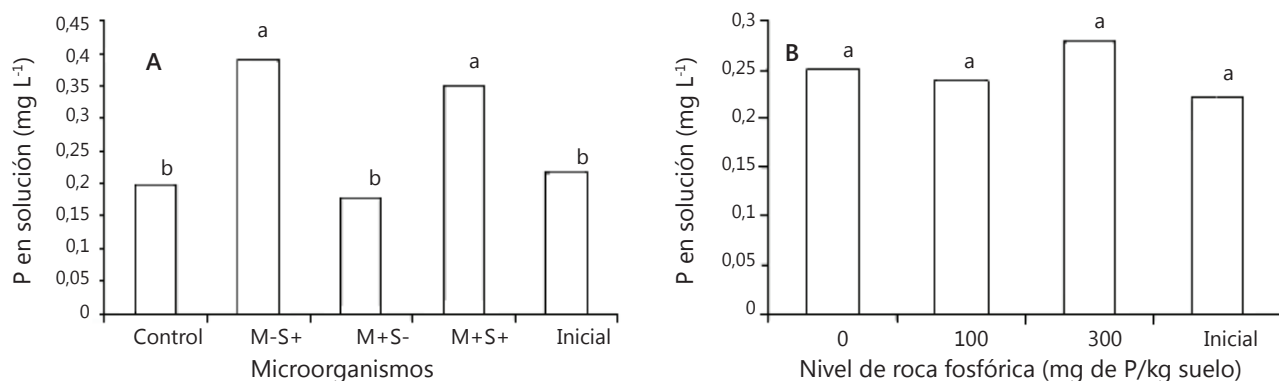


Figura 4. Valor de P en solución del suelo sembrado con plantas de caupí sometido a diferentes tratamientos de microorganismos y roca fosfórica. Efecto de un HMA y de un MSP y la combinación de los dos sobre la desorción de P en el suelo (A); efecto de tres niveles de roca fosfórica (0, 100 y 300 mg de P kg⁻¹ suelo) sobre la desorción de P en el suelo (B). Control: plantas sin HMA y sin MSP, M- (sin HMA), M+ (con HMA), S- (sin MSP) y S+ (con MSP).

Los resultados encontrados indican que el hongo *Mortierella* sp. fue efectivo para la desorción de P en el suelo. Este efecto observado para los MSP, se ha explicado por la liberación de H⁺ y formación de Ca²⁺ complejo de ácido oxálico (Whitelaw, 1999; Welch, 2002; Osorio, 2011). En diversos trabajos se ha encontrado, que los hongos solubilizadores de fosfatos pueden mejorar directamente la disponibilidad del P en suelos fertilizados y no fertilizados, demostrando su aplicabilidad en el incremento de la productividad

de diferentes cultivos (Tarafdar y Rao, 1996; Vázquez *et al.*, 2000). La eficiencia de las mezclas de especies y cepas de microorganismos, sobre la producción de cultivos, es un fenómeno complejo el cual depende de la compatibilidad y genotipo de las cepas, el clima, los suelos, la disponibilidad de nutrientes y los genotipos de plantas, entre otros (De Lima *et al.*, 2011). Se ha encontrado que el caupí responde muy bien a las adiciones de P, cuando el suelo presenta niveles menores de 10 ppm de este elemento; sin embargo,

las adiciones de P en suelos con concentraciones superiores, no han mostrado respuestas significativas (Adetunji, 1994). En el presente trabajo se partió de una concentración inicial de 24 ppm, lo cual podría explicar parcialmente, porqué la presencia del hongo *Mortierella* sp., no incrementó significativamente los parámetros de desarrollo de las plantas de caupí (Figura 4). Otros aspectos que pueden limitar el uso de los MSP son la capacidad para establecerse en la rizosfera y la posibilidad de que el P solubilizado puede ser fijado nuevamente en el suelo (Pérez *et al.*, 2004). Para explorar la aplicabilidad en cultivos en campo, de las cepas usadas en este trabajo, se debe evaluar su efecto sobre diferentes tipos de suelos, localidades, clima, niveles de nutrientes y genotipos de plantas, entre otros factores, con el fin de encontrar aquellas

condiciones en donde efectivamente puedan contribuir como alternativas económicas para su uso en los suelos tropicales (Akintokun *et al.*, 2003; Akande *et al.*, 2008).

En este trabajo se encontró que la incorporación de la cepa usada de *G. fasciculatum*, incrementó significativamente el crecimiento de las plantas de caupí bajo condiciones de casa de malla. Esta cepa presentó potencial para ser evaluada en las diversas condiciones que se pueden encontrar en cultivos en campo, con el fin de buscar alternativas para reducir costos y mejorar la productividad de la leguminosa. Se debe evaluar también la co-inoculación del HMA con MSP, en suelos con baja disponibilidad de P, para determinar si se obtienen efectos significativos sobre las plantas de caupí.

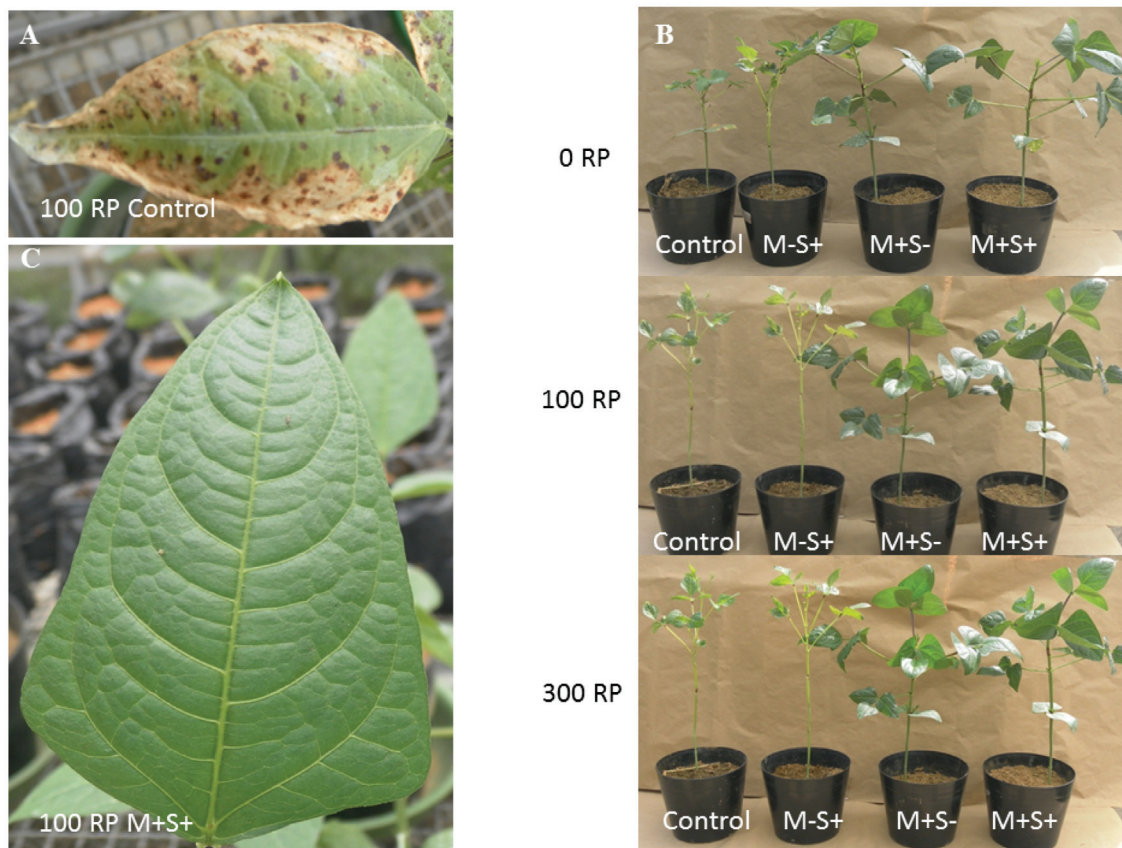


Figura 5. Plantas de caupí sometidas a diferentes tratamientos de microorganismos y RP. Aspecto visual de una hoja del tercio medio de una planta de caupí adicionada con 100 mg de P kg⁻¹ suelo, sin la aplicación del HMA, ni el MSP (A); aspecto visual de plantas de caupí sometidas a inoculación con un HMA y un MSP, bajo tres niveles de RP (RF) (0, 100 y 300 mg de Pkg⁻¹ suelo) (B); aspecto visual de una hoja del tercio medio de una planta de caupí adicionada con 100 mg de P kg⁻¹ suelo (C). Control: plantas sin HMA y sin MSP, M- (sin HMA), M+ (con HMA), S- (sin MSP) y S+ (con MSP).

BIBLIOGRAFÍA

- Adetunji, M. 1994. Phosphorus requirement of a maize-cowpea sequential cropping on a paleudult. *Fertilizer Research* 39(3): 161-166.
- Akande, M., E. Makinde and M. Adetunji. 2011. Response of maize and cowpea grown sequentially to application of phosphate rock in the humid tropics. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42(9): 1027-1037.
- Akande, M., M. Adetunji and S. Ojeniyi. 2008. Effects of phosphate rock on chemical properties of soil in maize/cowpea grown in sequence. *Nigerian Journal of Soil Science* 18(1): 99-107.
- Akintokun, O., M. Adetunji and P. Akintokun. 2003. Phosphorus availability to soybean from an indigenous phosphate rock sample in soil from southwest Nigeria. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65(1): 35-41.
- Aziz, T. and M. Habte. 1987. Determining vesicular-arbuscular micorrizica effectiveness by monitoring P status of leaf disk. *Canadian Journal of Microbiology* 33(12): 1097-1101.
- Boby V., A. Balakrishna and D. Bagyaraj. 2008. Interaction between *Glomus mosseae* and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea. *Microbiological Research* 163(6): 693-700.
- Chien, S. and L. Hammond. 1978. A comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate rocks for direct application. *Soil Science Society of America Journal* 42(6): 935-939.
- Davies, F., J. Potter and R. Linderman. 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure resistance affect drought resistance and extraradical hyphae development on pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology* 139(3): 289-294.
- De Lima, A., T. Xavier, C. De Lima, J. Oliveira, A. Mergulhao and M. Figueiredo. 2011. Triple inoculation with *Bradyrhizobium*, *Glomus* and *Paenibacillus* on cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) development. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(3): 919-926.
- Diallo, A., P. Sambbb and H. Macauley. 2001. Water status and stomatal behaviour of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, plants inoculated with two *Glomus* species at low soil moisture levels. *European Journal of Soil Biology* 37(3): 187-196.
- Edwards, D., B. Kang and K. Danso. 1981. Differential response of six cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivars to liming in an ultisol. *Plant and Soil* 59(1): 61-73.
- Ehlers, J. and A. Hall. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 53(1-3): 187-204.
- Giovanetti, M. and M. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3): 489-500.
- Hause, B. and T. Fester. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221(2): 184-196.
- Hoeksema, J., V. Chaudhary, C. Gehring, N. Johnson, J. Karst, R. Koide, A. Pringle, C. Zabinski, J. Bever, J. Moore, G. Wilson, J. Klironomos and J. Umbanhowar. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13(3):394-407.
- Johansson, F., R. Paul and R. Finlay. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48(1):1-13.
- Kongpun, A., B. Dell and B. Rerkasem. 2011. Alleviating acid soil stress in cowpea with a local population of arbuscular mycorrhizal fungi. *African Journal of Biotechnology* 10(65): 14410-14418.
- Kormanik, P., A.W. Bryan and R. Schultz. 1980. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Canadian Journal of Microbiology* 26(4): 536-538.
- Mansfeld, K., J. Karsen and L. Bødker. 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intrarradices*. *FEMS Microbiology Ecology* 41(2): 133-140.
- Murphy, J. and J. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27(1): 31-36.

- Ngwene, B., E. George, W. Claussen and E. Neumann. 2010. Phosphorus uptake by cowpea plants from sparingly available or soluble sources as affected by nitrogen form and arbuscular-mycorrhiza-fungal inoculation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173(3): 353-359.
- Osorio, N. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60(1): 3621-3643.
- Osorio, N. 2011. Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes en suelos ácidos del trópico. *Suelos Ecuatoriales* 41(1): 74-91.
- Osorio, N. and M. Habte. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Research and Management* 15(3): 263-274.
- Osorio, N. and M. Habte. 2013. Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biology and Fertility of Soils* 49(4):481-486.
- Phillips, J. and D. Hayman. 1970. Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Journal Transactions of the British Mycological Society* 55(1): 158-161.
- Pérez, J., N. Osorio y C. Álvarez. 2004. Crecimiento, absorción de fósforo y morfología de la raíz en espárragos inoculados con hongos micorrízicos y *Pseudomonas* fluorescentes. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 57(2): 2373-2381.
- Porter, W. 1979. The "Most Probable Number" method of reenumerating infective propagules of vesicular arbuscular micorrízica fungi in soil. *Australian Journal of Soil Research* 17(3): 515-519.
- Rajapakse, S., D. Zuberer and J. Miller. 1989. Influence of phosphorus level on VA Mycorrhizal colonization and growth of cowpea cultivars. *Plant and Soil* 114(1): 45-52.
- Randhawa, P., L. Condon, H. Di, S. Sinaj and R. McLenaghan. 2006. Phosphorus availability in soils amended with different phosphate fertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 37(1-2): 25-39.
- Saidou, A., B. Singh, R. Abaidoo, E. Iwuafor and N. Sanginga. 2012. Response of cowpea lines to low phosphorus tolerance and response to external application of P. *African Journal of Microbiology Research* 6(26): 5479-5485.
- Shrivastava, M, B. Bhujbal and S. D'Souza. 2007. Agronomic efficiency of Indian rock phosphate in acidic soils employing radiotracer A-value technique. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38(3-4): 461-471.
- Singh, H. and M. Reddy. 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.
- Tarafdar, J. and A. Rao. 1996. Contribution of *Aspergillus* strains to acquisition of phosphorus by wheat (*Triticum aestivum* L.) and chick pea (*Cicer arietinum* Linn.) grown in a loamy sand soil. *Applied Soil Ecology* 3(2): 109-114.
- Vázquez, P., G. Holguín, M. Puente, A. López and Y. Bashan. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of semiarid mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30(5-6):460-468.
- Wakelin, A., R. Warren, P. Harvey and P. Ryder. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* 40(1): 36-43.
- Welch, S., A. Taunton and J. Banfield. 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal* 19(1): 343-367.
- Whitelaw, M. 1999. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69(1): 99-151.
- Yaseen, T., T. Burni and F. Hussain. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on nutrient uptake, growth and productivity of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. *African Journal of Biotechnology* 10(43): 8593-8598.