Scientific note https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2023.07.008

Interaction of *Claroideoglomus claroideum* co-inoculation with saprophytic phosphofungi: effect on the development of micropropagated native potato plantlets

Interacción de la co-inoculación de *Claroideoglomus claroideum* con fosfohongos saprófitos: efecto en el desarrollo de plántulas micropropagadas de papa nativa

Alfredo Morales[1*]; Jaime Solano[2]; Fernando Borie[2]; Gustavo Curaqueo[2]; Claudia Castillo[2]

[1]Universidad de La Frontera. Av. Francisco Salazar núm. 01145, Temuco, CHILE.
[2]Universidad Católica de Temuco. Rudecindo Ortega 02950, Temuco, CHILE.
*Corresponding author: alfredo.morales@ufrontera.cl

Abstract

In many agricultural crops, arbuscular mycorrhizal fungi co-exist and interact with saprophytic fungi. This study aimed to analyze the effects of two free-living phosphofungi on the growth of potatoes co-inoculated with *Claroideoglomus claroideum.* Micropropagated native potato plantlets were transferred to a sterile Andisol previously inoculated with *C. claroideum* and subsequently two saprophytic fungi. The treatments were: *C. claroideum* (T0), *C. claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), *C. claroideum* + *Penicillium albidum* (T2), and *C. claroideum* + *T. pinophilus* + *P. albidum* (T3). At harvest, the most relevant results show that in T3 the height, shoot dry weight, root length and P acquisition of the potato plants were increased. Therefore, dry weight and P absorbed by minitubers were enhanced two and three-fold, respectively, compared with T0, along with an increase in the length of the thinnest roots. It is concluded that co-inoculation of this fungal consortium could be an advantageous alternative to be used as a bioinoculant by potato tuber seed producers in sustainable agriculture.

Keywords: *Penicillium albidum, Talaromyces pinophilus,* WinRHIZO, minituber, root architecture.

Resumen

En muchos cultivos agrícolas, los hongos micorrícicos arbusculares coexisten e interactúan con hongos saprófitos. El objetivo de este estudio fue analizar los efectos de dos fosfohongos de vida silvestre sobre el crecimiento de papas co-inoculadas con *Claroideoglomus claroideum.* Se trasfirieron plántulas de papa nativa micropropagadas a suelo Andisol estéril previamente inoculado con *C. claroideum*, y subsecuentemente con dos hongos saprófitos. Los tratamientos fueron: *C. claroideum* (T0), *C. claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), *C. claroideum* + *Penicillium albidum* (T2) y *C. claroideum* + *T. pinophilus* + *P. albidum* (T3). En la cosecha, los resultados más relevantes mostraron que el T3 incrementó la altura, el peso seco de los brotes, la longitud de las raíces y la absorción de P en las plántulas de papa. El peso seco y el P absorbido por los minitubérculos incrementaron al doble y triple, respectivamente, en comparación con el T0; además, aumentó la longitud de las raíces más delgadas. Se concluye que la co-inoculación de dicha asociación de hongos podría ser una alternativa favorable para su uso como bioinoculante por productores de semillas de tubérculos de papa en la agricultura sustentable.

Palabras clave: *Penicillium albidum, Talaromyces pinophilus,* WinRHIZO, minitubérculos, arquitectura de raíz.

Please cite this article as follows (APA 7): Morales, A., Solano, J., Borie, F., Curaqueo, G., & Castillo, C. (2024). Interaction of *Claroideoglomus claroideum* co-inoculation with saprophytic phosphofungi: effect on the development of micropropagated native potato plantlets. *Revista Chapingo Serie Horticultura, 30*(2) 3-12. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2023.07.008

Revista Chapingo Serie Horticultura

Received: July 7, 2023 / Accepted: February 6, 2024

https://revistas.chapingo.mx/horticultura/

Introduction

Climate change and agricultural malpractices such as excessive use of fertilizers and pesticides have heightened the effects of abiotic stresses on crop productivity and ecosystem degradation (Begum et al., 2019). In this context, there is an urgent need for the application of environmentally-friendly management techniques such as the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for enhancing crop productivity (Khaliq et al., 2022). These symbiotic fungi are some of the most commonly occurring living organisms in soil, producing benefits for the plant-soil ecosystem in terms of growth, development, stress tolerance, soil pollutant remediation, C-sequestration, food security and agricultural sustainability (Ortas & Rafique, 2018). Moreover, the symbiosis improves the supply of water and macronutrients, such as P and N, to the host plant with benefits for both partners (Azcón-Aguilar & Barea, 2015).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) interact with almost all organisms in the mycorrhizosphere, including saprophytic fungi; however, few studies have been carried out on their synergistic interaction, especially with those microorganisms belonging to the same P cycle. Saprophytic fungi live on the rhizoplane and mycorrhizosphere of plants and procure their nutritional requirements from organic matter and other elements in the soil (Azcón-Aguilar & Barea, 2015). Some of these fungi benefit plant growth by transforming fixed P into more available forms through mechanisms that include the release of chelant organic acids and phosphatase enzymes (Andrino et al., 2021; Rawat et al., 2021).

On the other hand, it has been observed that when microorganisms act together, they provide greater benefits to the plant than in isolation (Perea et al., 2019). In this context, Castillo et al. (2013) reported that inoculation of chili pepper with the native AMF *Claroideoglomus claroideum* accelerated fruit ripening along with increasing yield and quality, while co-inoculation with *Penicillium albidum* favored the development of a higher fruit number. Additionally, mycorrhizal inoculation alters the root architecture and some studies have shown that the nutrient absorption capacity of inoculated roots is enhanced in comparison with non-inoculated ones (Ortas & Rafique, 2018).

Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential of two saprophytic phosphofungi to promote the development of native potato minitubers when inoculated with *Claroideoglomus claroideum*.

Introducción

El cambio climático y las malas prácticas agrícolas, como el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas, han agudizado los efectos del estrés abiótico sobre la productividad de los cultivos y la degradación de los ecosistemas (Begum et al., 2019). En este contexto, apremia la necesidad de aplicar técnicas de manejo amigables con el ambiente, como el uso de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), para mejorar la productividad de los cultivos (Khaliq et al., 2022). Estos hongos simbióticos son de los organismos vivos más comunes en el suelo, y producen beneficios para el ecosistema planta-suelo en términos de crecimiento, desarrollo, tolerancia al estrés, remediación de contaminantes del suelo, captura de C, seguridad alimentaria y sostenibilidad agrícola (Ortas & Rafique, 2018). Además, la simbiosis mejora el suministro de agua y macronutrientes (como P y N), a la planta huésped, e implica beneficios para ambos socios (Azcón-Aguilar & Barea, 2015).

Los HMA interactúan con casi todos los organismos de la micorrizósfera, incluso con hongos saprófitos; sin embargo, se ha estudiado poco sobre su interacción sinérgica, especialmente con la microbiota que pertenece al mismo ciclo del P. Los hongos saprófitos viven en el rizoplano y la micorrizósfera de plantas, y satisfacen sus requerimientos nutricionales a partir de materia orgánica y otros elementos en el suelo (Azcón-Aguilar & Barea, 2015). Algunos de estos hongos benefician el crecimiento de las plantas al transformar el P fijo en formas más accesibles a través de mecanismos que incluyen la liberación de ácidos orgánicos quelantes y enzimas fosfatasas (Andrino et al., 2021; Rawat et al., 2021).

Por otro lado, se ha observado que cuando los microorganismos actúan juntos proveen grandes beneficios a la planta, en comparación con la acción individual (Perea et al., 2019). En este contexto, Castillo et al. (2013) reportaron que la inoculación de chiles con el HMA nativo *Claroideoglomus claroideum* aceleró la maduración del fruto, además de incrementar el rendimiento y la calidad; mientras que, la co-inoculación con *Penicillium albidum* favoreció el desarrollo de más frutos. Adicionalmente, la inoculación micorrícica altera la estructura de la raíz, y algunos estudios han demostrado que la capacidad de absorción de nutrientes de las raíces inoculadas se incrementa en comparación con las no inoculadas (Ortas & Rafique, 2018).

Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de dos fosfohongos saprófitos para promover el desarrollo de minitubérculos de papa nativa cuando se inoculan con *Claroideoglomus claroideum*.

Materials and methods

Experimental design

Four mycorrhizal treatments were used for the trial: 1) *C. claroideum* (T0), 2) *C. claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), 3) *C. claroideum* + *P. albidum* (T2), and 4) *C. claroideum* + *T. pinophilus* + *P. albidum* (T3). Each of the four treatments had five replicates resulting in a total of 20 experimental units.

Biological materials

The *C. claroideum* inoculum used was a native morphotype isolated from agricultural acidic soils in Southern Chile (Castillo et al., 2009). The AMF inoculum consisted of a mixture of rhizospheric soil containing spores, hyphae and fragments of colonized roots (with an average potential of 50 spores·mL^{-1}).

Two saprophytic phosphofungi were used (as a suspension of spores): *P. albidum* (2.7 x 10^7 CFU in 750 mL) and *T. pinophilus* (8 x 10^7 CFU in 750 mL), belonging to the fungal collection of the Department of Chemical Sciences and Natural Resources of the Universidad de la Frontera, Chile (Morales et al., 2011).

The soil used was an acidic Andisol obtained from the Unidad de Docencia Práctica Pillanlelbún located 15 km north of Temuco (38° 39' S and 72° 27' W). It had the following chemical characteristics: P Olsen 13 mg·kg^{-1}, K available 192 mg·kg^{-1}, pH 5.28, soil organic matter (SOM) 18.7 %, exchangeable Ca 4.04 cmol$_{(+)}$·kg^{-1}, exchangeable Mg 1.06 cmol$_{(+)}$·kg^{-1}, exchangeable Al 0.074 cmol$_{(+)}$·kg^{-1}, and Al saturation 1.28 %. This soil was sieved at 2 mm, then mixed with quartz sand (70:30, v:v) and sterilized by tyndallization for 1 h for 3 consecutive days.

Potato explant multiplication

Prior to the establishment of the assay, a multiplication of explants of potato variety 'Güicoña' nodal segments was carried out in Murashige and Skoog (1962) solid medium. The aseptically sealed medium remained in the growth chamber for 30 d, with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, 200 to 300 µE·m^{-2}·s^{-1} of illumination and a temperature of 22 °C. For the acclimatization process, replicates of homogeneous plantlets were transferred to seedling trays with sterile peat located in containers covered with transparent plastic where they remained in the growth chamber for 15 d with moisture maintained through manual irrigation. Subsequently, the containers were moved to the greenhouse and the lid was replaced with plastic wrap.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Se estudiaron cuatro tratamientos micorrícicos: 1) *C. claroideum* (T0), 2) *C. claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), 3) *C. claroideum* + *P. albidum* (T2) y 4) *C. claroideum* + *T. pinophilus* + *P. albidum* (T3). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones, lo cual dio un total de 20 unidades experimentales.

Materiales biológicos

Como inóculo se utilizó *C. claroideum,* un morfotipo nativo aislado de suelos ácidos del sur de Chile (Castillo et al., 2009). El inóculo del HMA consistió en una mezcla de suelo rizosférico con esporas, hifas y fragmentos de raíces colonizadas (con potencial promedio de 50 esporas·mL^{-1}).

Se utilizaron dos fosfohongos saprófitos (como una suspensión de esporas): *P. albidum* (2.7 x 10^7 UFC en 750 mL) y *T. pinophilus* (8 x 10^7 UFC en 750 mL), pertenecientes a la colección de hongos del Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, de la Universidad de la Frontera, Chile (Morales et al., 2011).

El suelo utilizado fue Andisol ácido, obtenido de la Unidad de Docencia Práctica Pillanlelbún, ubicada a 15 km al norte de Temuco (38° 39' S y 72° 27' O). El suelo contaba con las siguientes características químicas: P de Olsen 13 mg·kg^{-1}, K disponible 192 mg·kg^{-1}, pH de 5.28, materia orgánica del suelo 18.7 %, Ca intercambiable 4.04 cmol$_{(+)}$·kg^{-1}, Mg intercambiable 1.06 cmol$_{(+)}$·kg^{-1}, Al intercambiable 0.074 cmol$_{(+)}$·kg^{-1} y saturación de Al de 1.28 %. El suelo se pasó por un tamiz de 2 mm, se mezcló con arena sílica (70:30, v:v) y se esterilizó mediante tindalización durante 1 h por 3 días consecutivos.

Propagación de explantes de papa

Antes de establecer el ensayo, se propagaron los explantes de segmentos nodales de papa variedad 'Güicoña' en medio sólido Murashige y Skoog (1962). Los medios sellados asépticamente permanecieron en la cámara de crecimiento durante 30 d, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, 200 a 300 µE·m^{-2}·s^{-1} de iluminación y una temperatura de 22 °C. Para el proceso de aclimatación, se trasladaron plántulas homogéneas a charolas de germinación con turba estéril en contenedores cubiertos con una tapa de plástico transparente, y permanecieron en la cámara de crecimiento durante 15 d, con humedad mantenida mediante riego manual. Posteriormente, los contenedores se trasladaron al invernadero y se sustituyó la tapa por plástico.

Experimental setup

Potato plantlets in seedling trays with peat attached to the roots were transferred to 750 mL containers containing the sterile substrate inoculated with 10 mL·of *C. claroideum*. For the inoculation with the saprophytic phosphofungi, two 3-cm holes were made in the substrate, on which 6.4 mL of suspension of the respective fungus was added. Every 15 d, 20 mL of a 0.055 M KNO_3 solution was added to each jar. The harvest was carried out 108 days after establishment during the phenological stage of tuber development. During the assay, moisture was maintained at field capacity.

Variables evaluated

In the plant, the following characteristics were determined: height, shoot dry weight (SDW), root dry weight (RDW), minituber (mT) dry weight (mTDW), mT number, and P in the mT. Also, with a WinRHIZO® image analyzer, the distribution of root length according to diameter was determined.

In the soil, the following parameters were determined: labile-P (it was carried out with 0.5 M $NaHCO_3$ pH 8.5 according to the methodology of Sadzawka et al. [2006], but mineralizing the extract to discriminate Pi and Po [Secretaría de Economía, 2001]), acid phosphatase activity (P-ase) (by hydrolysis of *p*-nitrophenyl-phosphate [Tabatabai & Bremmer, 1969] with modifications reported by Rubio et al. [1990] for volcanic soils), and total microbiological activity (it was determined by the fluorescein diacetate hydrolysis [FDA] method according to Schnürer and Roswall [1982]).

Statistical analysis

For all variables, the results obtained were subjected to a normality and homogeneity test. ANOVA was performed and the differences between means were subjected to Tukey's multiple comparison test ($P \leq 0.05$), using SPSS version 15.0 software.

Results and discussion

The co-inoculation of the Andisol with *C. claroideum* and the two saprophytic phosphofungi (T3) significantly ($P < 0.05$) increased the height and SDW of the potato plants, by 67 and 110 %, respectively, in relation to T0, which was the treatment inoculated only with AMF. With soil co-inoculation of *C. claroideum* and only one saprophytic phosphofungus (T1 or T2), no significant differences ($P > 0.05$) were observed among treatments in plant height and SDW, although better results were observed with *P. albidum*. In the case of the mTDW, it

Arreglo experimental

Las plántulas de papa de las charolas de germinación con turba adherida a las raíces se transfirieron a recipientes de 750 mL que contenían el sustrato estéril inoculado con 10 mL de *C. claroideum*. Para la inoculación con los fosfohongos saprófitos, se hicieron dos orificios de 3 cm en el sustrato, en los cuales se añadieron 6.4 mL de suspensión de los hongos respectivos. Cada 15 d se añadieron 20 mL de una solución de 0.055 M de KNO_3 a cada recipiente. La cosecha se realizó 108 días después del establecimiento durante la etapa fenológica de desarrollo del tubérculo. La humedad se mantuvo a capacidad de campo durante todo el experimento.

Variables evaluadas

En la planta se determinaron las siguientes características: altura, peso seco del brote (PSB), peso seco de raíz (PSR), peso seco de minitubérculos (mT) (PSmT), número de mT y P en el mT. Además, se determinó la distribución de la longitud de la raíz de acuerdo con su diámetro mediante el analizador de imágenes WinRHIZO®.

Del suelo se determinaron los siguientes parámetros: P lábil (estimado con 0.5 M de $NaHCO_3$ a pH 8.5 conforme a la metodología de Sadzawka et al. [2006], pero con el extracto mineralizado para discriminar Pi y Po [Secretaría de Economía, 2001]), actividad de la fosfatasa ácida (P-asa) (determinada mediante hidrólisis del *p*-nitrofenil-fosfato [Tabatabai & Bremmer, 1969] con modificaciones reportadas por Rubio et al. [1990] para suelos volcánicos) y actividad microbiológica total (determinada por el método de hidrólisis del diacetato de fluoresceína [FDA] conforme a Schnürer y Roswall [1982]).

Análisis estadístico

Los resultados de todas las variables se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad. Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa SPSS ver. 15.0.

Resultados y discusión

La co-inoculación del suelo Andisol con *C. claroideum* y los dos fosfohongos saprófitos (T3) incrementó significativamente ($P < 0.05$) la altura y el PSB de las plantas de papa en 67 y 110 %, respectivamente, en comparación con T0, que fue el tratamiento inoculado solamente con HMA. En el caso de la co-inoculación del suelo con *C. claroideum* y un fosfohongo saprófito (T1 o T2), no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos en altura de planta y PSB, aunque se observaron mejores resultados con *P. albidum.* En el caso del PSmT, es importante destacar la

is important to highlight the great difference obtained between T0 and T3, the latter increasing the weight by 211 %, with respect to T0 (Table 1).

On the other hand, in potato plant root length, it was again observed that the greatest length was obtained with T3, without significant differences ($P > 0.05$) in relation to individual inoculation with the saprophytic phosphofungi (T1 or T2), but presented differences with T0. The T3 treatment, corresponding to the co-inoculation of *C. claroideum* with the two saprophytic phosphofungi, significantly increased the length of fine roots (diameter 0 – 0.25 mm) (Table 2). In general, it was observed in the root architecture that when the gran diferencia obtenida entre T0 y T3, pues este último aumentó el peso en 211 % respecto al T0 (Cuadro 1).

Por otra parte, se observó que la mayor longitud de raíces se obtuvo con el T3, sin diferencias significativas ($P > 0.05$) con T1 y T2, pero con diferencias estadísticas significativas con T0. El T3, correspondiente a la co-inoculación de *C. claroideum* con los dos fosfohongos saprófitos, incrementó significativamente la longitud de las raíces finas (diámetro 0 – 0.25 mm) (Cuadro 2). Además, se observó que al aumentar el diámetro disminuye la longitud de la raíz en todos los tratamientos y sin diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos (Cuadro 2).

Table 1. Potato parameters in an assay of inoculation with Claroideoglomus claroideum (T0), *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), *Claroideoglomus claroideum* + *Penicillium albidum* (T2), and *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* + *Penicillium albidum* (T3) cultivated in an Andisol.

Cuadro 1. Parámetros de papa cultivada en suelo Andisol e inoculada con *Claroideoglomus claroideum* (T0), *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), *Claroideoglomus claroideum* + *Penicillium albidum* (T2) y *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* + *Penicillium albidum* (T3).

Treatment / Tratamiento	Height (cm) / Altura (cm)	SDW (g) / PSB (g)	RDW (g) / PSR (g)	mTDW (g) / PSmT (g)	mT (N°) / mT (Núm.)	P mT (mg P) / P mT (mg de P)
T0	32.5 b[z]	0.71 b	0.023 a	1.18 b	3 a	2.22 b
T1	38.3 ab	1.25 ab	0.036 a	2.50 ab	3 a	5.47 a
T2	49.7 ab	1.38 ab	0.032 a	2.26 ab	3 a	4.27 ab
T3	54.3 a	1.49 a	0.035 a	3.67 a	3 a	6.77 a
LSD / DMSH	13.26	0.68	0.02	1.17	1.22	1.95

SDW = shoot dry weight; RDW = root dry weight; mTDW = minituber dry weight; mT = minituber number; LSD = least significant difference. [z]Means for each response followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, $P \leq 0.05$).

PSB = peso seco de brote; PSR = peso seco de raíz; PSmT = peso seco de minitubérculos; mT = número de minitubérculos; DMSH = diferencia mínima significativa honesta. [z]Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Table 2. Distribution of root length in an assay of potato inoculated with *Claroideoglomus claroideum* (T0), *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), *Claroideoglomus claroideum* + *Penicillium albidum* (T2), and *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* + *Penicillium albidum* (T3).

Cuadro 2. Distribución de la longitud y el diámetro de las raíces del cultivo de papas en suelo Andisol inoculadas con *Claroideoglomus claroideum* (T0), *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* (T1), *Claroideoglomus claroideum* + *Penicillium albidum* (T2) y *Claroideoglomus claroideum* + *Talaromyces pinophilus* + *Penicillium albidum* (T3).

Treatment / Tratamiento	Root length (cm) / Longitud de raíz (cm)	Diameter (mm) / Diámetro (mm)			
		0 - 0.25	0.25 - 0.50	0.50 - 0.75	0.75 - 1.00
T0	202 b[z]	113 b	56 a	10 a	6 a
T1	374 a	233 ab	96 a	25 a	8 a
T2	346 ab	220 ab	95 a	20 a	6 a
T3	385 a	246 a	96 a	25 a	7 a
LSD / DMSH	218.46	154.24	39.76	14.50	5.33

LSD = least significant difference. [z]Means for each response followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, $P \leq 0.05$).

DMSH = diferencia mínima significativa honesta. [z]Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

diameter increases, the length of the root decreases, but without significant differences ($P > 0.05$) among treatments (Table 2).

Among all interactions in a soil environment, fluorescein diacetate hydrolysis enzyme activity is commonly used as an early indicator of biological activity in soils. This hydrolysis is mostly accepted as an accurate, simple and fast method for measuring total microbial activity in a range of environmental samples, including soils (Patle et al., 2018).

Co-inoculation of *C. claroideum* with the two saprophytic phosphofungi (T3) significantly increased ($P < 0.05$) the microbial activity measured by FDA reflexing the highest microbial charge; however, simultaneously there was a decrease in the phosphatase activity of the soil (Table 3). On the other hand, the P availability from the different labile fractions of the soil was different depending on the inoculation treatment used in the trial. Co-inoculation of AMF with *P. albidum* (T2) significantly increased ($P < 0.05$) the total and inorganic labile-P in the soil, while, with the mycorrhizal fungus inoculated with *T. pinophilus* (T1), a drastic decrease ($P > 0.05$) in the availability of the nutrient was observed (Table 3).

The plantlets used for the assay were obtained by micropropagation of nodal explants of pathogen-free potato segments, with more fragile plants in the early stages of phenological development. The native 'Güicoña' variety was used in the study; however, in the country there is a great variety of different shapes and

Entre todas las reacciones presentes en el medio edáfico, la hidrólisis del FDA se utiliza habitualmente como indicador temprano de la actividad biológica en los suelos. Esta hidrólisis es ampliamente aceptada como un método rápido, preciso y sencillo para medir la actividad microbiana total en una serie de muestras ambientales, incluidos los suelos (Patle et al., 2018).

La co-inoculación de *C. claroideum* con los dos fosfohongos saprófitos (T3) incrementó significativamente ($P < 0.05$) la actividad microbiana medida por FDA, lo cual refleja la mayor carga microbiana; sin embargo, simultáneamente hubo una disminución en la actividad de la fosfatasa del suelo (Cuadro 3). Por otro lado, la disponibilidad del P en las distintas fracciones lábiles del suelo fue diferente en función del tratamiento de inoculación utilizado en el ensayo. La co-inoculación de HMA con *P. albidum* (T2) incrementó significativamente ($P < 0.05$) el P total e inorgánico del suelo, mientras que, el tratamiento con HMA más *T. pinophilus* (T1), presentó una disminución ($P > 0.05$) drástica de la disponibilidad del nutriente (Cuadro 3).

Como ya se mencionó, las plántulas utilizadas se obtuvieron mediante micropropagación de explantes de segmentos nodales de papa, libres de patógenos, con plantas más frágiles en los estadios tempranos de desarrollo fenológico. La variedad nativa 'Güicoña' se utilizó en el estudio; sin embargo, en el país hay una gran diversidad de formas y colores. Solano et al. (2013) reportaron que la riqueza alélica en una variedad se debe conservar para promover la biodiversidad, y

Table 3. Microbiological activity and labile-P in an assay of potato cultivated in an Andisol, and inoculated with *Claroideoglomus claroideum* (T0), *Claroideoglomus claroideum + Talaromyces pinophilus* (T1), *Claroideoglomus claroideum + Penicillium albidum* (T2), and *Claroideoglomus claroideum + Talaromyces pinophilus + Penicillium albidum* (T3).

Cuadro 3. Actividad microbiológica y P lábil en papa cultivada en suelo Andisol e inoculada con *Claroideoglomus claroideum* (T0), *Claroideoglomus claroideum + Talaromyces pinophilus* (T1), *Claroideoglomus claroideum + Penicillium albidum* (T2) y *Claroideoglomus claroideum + Talaromyces pinophilus + Penicillium albidum* (T3).

Treatment / Tratamiento	Microbiological activity / Actividad microbiológica		Labile-P ($mg \cdot kg^{-1}$) / P lábil ($mg \cdot kg^{-1}$)		
	FDA ($\mu g \cdot g^{-1}$) / FDA ($\mu g \cdot g^{-1}$)	P-ase ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$) / P-asa ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)	Total-P / P total	Inorganic-P / P inorgánico	Organic-P / P orgánico
T0	31.2 b[z]	0.90 b	12.9 b	11.0 c	1.91 a
T1	28.5 b	1.48 a	10.5 c	10.3 c	0.2 b
T2	34.6 b	0.87 b	18.4 a	17.0 a	1.4 a
T3	43.7 a	0.44 c	15.7 a	14.7 b	1.0 a
LSD / DMSH	5.92	0.27	1.80	1.43	0.32

FDA = fluorescein diacetate; P-ase = acid phosphatase activity; LSD = least significant difference. [z]Means for each response followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, $P \leq 0.05$).

FDA = diacetato de fluoresceína; P-asa = actividad de la fosfatasa ácida; DMSH = diferencia mínima significativa honesta. [z]Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

colors. Solano et al. (2013) reported that higher allelic richness in a variety must be conserved to promote biodiversity and also as a potential source of future potato varieties. In this regard, studies of this type can make an interesting contribution to local potato tuber seed growers working under sustainable conditions.

The greater growth of fine roots in the potato plants inoculated with *C. claroideum* together with the two saprophytic phosphofungi could suggest that these fungi acted as inducers of root development and thus allowed the plant to explore a greater volume of soil for the acquisition of nutrients. In this context, it has been reported that in soils with low P availability, plants can modify root architecture by increasing root hair development or lateral root growth (Niu et al., 2013). The formation of fine roots is critical for the uptake of nutrients and water from the soil; therefore, these fungi modified the root architecture to meet the water and nutritional requirements of potato plantlets. Sharma & Kaur, 2017; Toscano-Verduzco et al., 2020 reported the existence of microorganisms capable of producing plant growth hormones that play an important role in plant development, resulting in a plant–microorganism interaction which is a determining factor for the production of this type of hormone (Sun et al., 2019).

On the other hand, the decrease in P-ase observed in treatments T2 and T3 could be a result of the greater generation in the finest roots, since they allow a higher P absorption (PmT in Table 1), contrasting with the enzyme level which decreased in T2 and T3. It is known that P-ase exudation is inhibited with a high shoot/root P concentration and also that plants have evolved numerous morphological and physiological adaptations to cope with P limitation. These adaptations increase the roots' P-uptake surface area, mobilizing unavailable soil P (Vance et al., 2003). However, some plants, instead of relying on processes such as enzyme exudation, modify the morphology or architecture of their roots (Lyu et al., 2016; Shen et al., 2018).

Currently, there is a great variety of AMF ecotypes, with *C. claroideum*, a mycorrhizal fungus isolated from Andisols in Southern Chile, standing out among them. In terms of sustainable agriculture, the benefit that could be obtained with a joint inoculation of native potatoes with solubilizing fungi in highly fixing soils is noteworthy, possibly due to more effective P uptake. In this regard, the mobilization of P towards the mT in the saprophytic phosphofungi interaction with *C. claroideum* in this study shows that the interaction in the Andisol of *C. claroideum* with the two solubilizing phosphofungi (*T. pinophilus* and *P. albidum*) benefits the growth and yield of mT in potato plantlets. These results agree with what was reported by Sembiring et al. (2018) in oil palm seedlings, and Silitonga et al.

también como un recurso potencial para futuras variedades de papa. En este sentido, estudios de este tipo pueden hacer una contribución interesante a los productores locales de semillas de tubérculo de papa que operan en condiciones de sustentabilidad.

El mayor crecimiento de raíces delgadas en las plantas inoculadas con *C. claroideum* y los dos fosfohongos saprófitos podría sugerir que los hongos actuaron como inductores de desarrollo radicular, lo cual permitió a la planta abarcar un mayor volumen de suelo para la absorción de nutrientes. En este contexto, se ha reportado que en suelos con baja disponibilidad de P las plantas pueden modificar la arquitectura de sus raíces al incrementar el desarrollo de pilosidades o el crecimiento radicular lateral (Niu et al., 2013). La formación de raíces delgadas es crítica para la absorción de nutrientes y agua del suelo; por lo tanto, dichos hongos modificaron la forma de las raíces para satisfacer los requerimientos de agua y nutrientes de las plántulas de papa. Sharma y Kaur (2017) y Toscano-Verduzco et al. (2020) reportaron la existencia de microorganismos capaces de producir hormonas de crecimiento vegetativo, las cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la planta. Esto resulta en una interacción planta-microorganismo, que es un factor determinante para la producción de este tipo de hormonas (Sun et al., 2019).

Por otro lado, el decremento de la P-asa observado en los tratamientos T2 y T3 podría ser un efecto de la mayor producción de raíces delgadas, ya que presentan una mayor absorción de P (PmT en el Cuadro 1). Se sabe que la exudación de P-asa se inhibe con concentraciones altas de P en brotes/raíces, y que las plantas han realizado numerosas adaptaciones morfológicas y físicas para subsanar la limitación de P. Estas adaptaciones incluyen la ampliación de la superficie de absorción del P de la raíz, con lo cual se moviliza el P no disponible en el suelo (Vance et al., 2003). No obstante, algunas plantas, en lugar de depender de procesos como la exudación de enzimas, modifican la morfología y la arquitectura de sus raíces (Lyu et al., 2016; Shen et al., 2018).

Actualmente, existe una gran diversidad de ecotipos de HMA, y entre ellos destaca *C. claroideum*, hongo micorrícico aislado de los suelos Andisoles del sur de Chile. En términos de agricultura sustentable, el beneficio que se podría obtener con una inoculación conjunta de papas nativas con hongos solubilizadores en suelos de alta fijación es interesante, posiblemente debido a una absorción de P más efectiva. En este sentido, la movilización de P hacia el mT en este estudio muestra que la interacción en el suelo Andisol del *C. claroideum* con los dos fosfohongos solubilizadores (*T. pinophilus* y *P. albidum*) favorece el

(2018) in soybean and more concretely by Sembiring and Fauzi (2017), who reported in an Andisol that inoculation with *T. pinophilus* increased available P and potato production. In relation to inoculation with *P. albidum*, other studies confirm the observed benefits of cultivating clover, lettuce, and chili pepper in Andisols (Castillo et al., 2013). Consequently, inoculation with *P. albidum* would be applicable to various other types of plants, where *T. pinophilus* would have a possible solubilizing potential for P.

The quality of soil depends in part on its natural chemical and biological composition, and also on the changes caused by human use and management. Strategies based on biological indicators would be a suitable tool to evaluate the sustainability of the soil ecosystem. Soil enzyme activity studies are good and quick indicators to measure the ecosystem status and quality of soils (Patle et al., 2018). The phosphatase enzyme, produced by plants and microorganisms, plays an impotant role in the soluble organic P mineralization, being essential for P cycling in deficient soils.

Inoculation of *C. claroideum* with *T. pinophilus* increased P-ase levels in the soil, while the inoculation of the AMF with the two saprophytic phosphofungi significantly increased the FDA, which is indicative of a higher microbial biomass. The results are noteworthy since the FDA hydrolysis enzyme in the soil could serve as an indicator of the soil's potential to support biochemical processes, which are essential for maintaining soil fertility as well as soil health (Patle et al., 2018). In this sense, the beneficial increase in microbial biomass could induce a concomitant increase in P, N and S in their cells, producing a transient inmobilization of these nutrients for further mineralization.

Finally, the indiscriminate use of chemical fertilizers and pesticides has caused considerable environmental damage in recent years which, together with the growing demand for food, requires the use of increasingly productive and efficient agricultural systems. Several studies have shown that the application of plant growth-promoting microorganisms can be a valid substitute for chemical industry products and represents a valid eco-friendly alternative for avoiding the excessive application of soluble phosphate fertilizers. However, due to the complexity of interactions created with the numerous biotic and abiotic factors, the different formulates often show variable effects (Hernández-Fernández et al., 2021) and consequently there is an urgent need to develop new technological tools focused on mobilizing P soil fractions. especially those with higher lability. Our results showed that the interaction between AMF and *T. pinophilus* can improve plant growth by 13 to 56 % and P uptake by 15 to 69 %.

crecimiento y rendimiento de mT en las plántulas de papa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sembiring et al. (2018) en plántulas de palma aceitera, y por Silitonga et al. (2018) en soya. Sembiring y Fauzi (2017) reportaron que la inoculación con *T. pinophilus* incrementó el P disponible y la producción de papa cultivada en Andisol. En cuanto a la inoculación con *P. albidum,* otros estudios confirman los beneficios observados de cultivar trébol, lechuga y chile en Andisoles (Castillo et al., 2013). En consecuencia, la inoculación con *P. albidum* es aplicable a otros tipos de plantas, donde *T. pinophilus* tendría un posible potencial para solubilizar P.

La calidad del suelo depende parcialmente de su composición química y biológica natural, así como de los cambios provocados por el uso y la manipulación humana. Las estrategias basadas en indicadores biológicos son una herramienta adecuada para evaluar la sostenibilidad del ecosistema del suelo. Los estudios de actividad enzimática son buenos y rápidos indicadores para medir el estado del ecosistema y la calidad de los suelos (Patle et al., 2018). La enzima fosfatasa, producida por plantas y microorganismos, desempeña un papel fundamental en la mineralización del P orgánico soluble, lo cual es esencial para el ciclo del P en suelos deficientes.

La inoculación de *C. claroideum* con *T. pinophilus* elevó los niveles de P-asa en el suelo, mientras que la inoculación del HMA con los dos fosfohongos saprófitos incrementó significativamente la FDA, lo cual indica una mayor biomasa microbiana. Los resultados son de gran interés, ya que la enzima de la hidrólisis del FDA en el suelo podría servir como un indicador del potencial del suelo para sostener procesos bioquímicos, que son esenciales para mantener la fertilidad del suelo, así como su salud (Patle et al., 2018). En este sentido, el aumento benéfico de la biomasa microbiana podría inducir un incremento concomitante de P, N y S en sus células, lo cual produciría una inmovilización temporal de estos nutrientes para su posterior mineralización.

Por último, el uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas químicos ha provocado daños medioambientales considerables en los últimos años, lo cual, unido a la creciente demanda de alimentos, exige el uso de sistemas agrícolas cada vez más productivos y eficientes. Numerosos estudios han mostrado que el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal puede ser un sustituto adecuado de los productos de la industria química, y representa una alternativa viable y respetuosa con el ambiente para evitar la aplicación excesiva de fertilizantes fosfatados solubles. Sin embargo, debido a la complejidad de las interacciones creadas con los numerosos factores bióticos y abióticos, las diversas formulaciones a menudo muestran efectos variables (Hernández-Fernández et al.,

Conclusions

It is concluded that co-inoculation of *C. claroideum* with the two saprophytic phosphofungi enhanced mass and P content of 'Guicoña' native potato minitubers, together with root length and thinness and soil enzymatic activities when growing in an Andisol.

The results of this study supply background information for sustainable agriculture which requires satisfying nutritional aspects of plants through the use of eco-friendly management techniques that reduce the use of synthetic fertilizers, in this case by applying native beneficial microorganisms to improve potato yield.

Aknowledgements

The authors are grateful for the funding provided for this study through projects DIUFRO DI13-0029 and VIP-UCT 3864-2017.

End of English version

References / Referencias

Andrino, A., Guggenberger, G., Kernchen, S., Mikutta, R., Sauheitl, L., & Boy, J. (2021). Production of organic acids by arbuscular mycorrhizal fungi and their contribution in the mobilization of phosphorus bound to iron oxides. *Frontiers in Plant Science, 12*, 661842. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.661842

Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (2015). Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15*(2), 372-396. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000035

Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science, 10*, 1068. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068

Castillo, C. G., Morales, A., Rubio, R., Barea, J. M., & Borie, F. (2013). Interactions between native arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing fungi and their effect to improve plant development and fruit production by *Capsicum annuum* L. *African Journal and Microbiology Research, 7*(26), 3331-3340. https://doi.org/10.5897/AJMR2012.2363

Castillo, C., Sotomayor, L., Ortiz, C., Leonelli, G., Borie, F., & Rubio, R. (2009). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*Capsicum annuum* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research, 69*(1), 79-87. https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000100010

Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., & Cantoral, J. (2021). Culturable yeasts as biofertilizers and biopesticides for a sustainable agriculture: a comprehensive review. *Plants, 10*(5), 822. https://doi.org/10.3390/plants10050822

2021) y, en consecuencia, es urgente desarrollar nuevas herramientas tecnológicas enfocadas en movilizar las fracciones de P del suelo, especialmente aquellas con mayor labilidad. Los resultados del presente trabajo muestran que la interacción entre el HMA y *T. pinophilus* puede mejorar el crecimiento de las plantas entre 13 y 56 %, y la absorción de P entre 15 y 69 %.

Conclusiones

En papa nativa 'Guicoña' cultivada en suelo Andisol, la co-inoculación de *C. claroideum* con dos fosfohongos saprófitos incrementó la masa y el contenido de P de los minitubérculos, así como la longitud y delgadez de la raíz, y las actividades enzimáticas.

Los resultados ofrecen precedentes para la agricultura sustentable, la cual requiere satisfacer aspectos nutricionales de las plantas mediante técnicas amigables con el medio ambiente que reduzcan el uso de fertilizantes sintéticos, en este caso al aplicar microorganismos benéficos locales para mejorar el rendimiento de la papa.

Agradecimientos

Los autores agradecen el respaldo económico para este estudio otorgado a través de los proyectos DIUFRO DI13-0029 y VIP-UCT 3864-2017.

Fin de la versión en español

Khaliq, A., Perveen, S., Alamer, K. H., Haq, M. Z., Rafique, Z., Alsudays, I. M., Althobaiti, A. T., Saleh, M. A., Hussain, S., & Attia, H. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis to enhance plant-soil interaction. *Sustainability, 14*(13), 7840. https://doi.org/10.3390/su14137840

Lyu, Y., Tang, H., Li, H., Zhang, F., Rengel, Z., & Whalley, W. R. (2016). Major crop species show differential balance between root morphological and physiological responses to variable phosphorus supply. *Frontier in Plant Science, 7*, 1939. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01939

Morales, A., Alvear, M., Valenzuela, E., Castillo, C., & Borie, F. (2011). Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilizing fungi as potential biofertilizer. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 11*(4), 89-103. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000400007

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant, 15*(3), 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Niu, Y., Chai, R., Jin, G., Wang, H., Tang, C., & Zhang, Y. (2013). Response of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany, 112*(2), 391-408. https://doi.org/10.1093/aob/mcs285

Ortas, I., & Rafique, M. (2018). The mechanisms of nutrient uptake by arbuscular mycorrhizae. In Varma, A., Prasad, R., and Tuteja, N. (Eds.), *Mycorrhiza -nutrient uptake, biocontrol, ecorestoration* (pp. 1-19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1_1

Patle, P. N., Navnage, N. P., & Barange, P. K. (2018). Fluorescein diacetate (FDA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7*(6), 2103-2107. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.249

Perea, Y., Arias, R., Medel, R., Trejo, D., Heredia, G., & Rodríguez, Y. (2019). Effects of native arbuscular mycorrhizal and phosphate-solubilizing fungi on coffee plants. *Agroforestry Systems, 93*, 961-972. https://doi.org/10.1007/s10457-018-0190-1

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S.C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 21*, 49-68. https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7

Rubio, R., Moraga, E., & Borie, F. (1990). Acid phosphatase activity and vesicular-arbuscular infection associated with roots of four wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition, 13*(5), 585-598. https://doi.org/10.1080/01904169009364102

Sadzawka, A., Carrasco, M., Grez, R., Mora, M. L., Flores, H., & Neaman, A. (2006). *Métodos recomendados para los suelos de Chile.* Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/8541/NR33998.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Schnürer, J., & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied of Environment Microbiology, 43*(6), 1256-1261. https://doi.org/10.1128/aem.43.6.1256-1261.1982

Secretaría de Economía (2001). NMX-AA-029-SCFI-2001. *Análisis de aguas - determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas*. Secretaría de Economía, Estados Unidos de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166773/NMX-AA-029-SCFI-2001.pdf

Sembiring, M., & Fauzi. (2017). Bacterial and fungi phosphate solubilization effect to increase nutrient uptake and potatoes (*Solanum tuberosum* L.) production on Andisol Sinabung area. *Journal of Agronomy, 16*(3), 131-137. https://doi.org/10.3923/ja.2017.131.137

Sembiring, M., Sakiah, J., & Wahyuni, M. (2018). The inoculation of mycorrhiza and *Talaromyces pinophilus* toward the improvement in growth and phosphorus uptake of oil palm seedlings (*Elaeis guineensis* Jacq) on saline soil media. *Bulgarian Journal of Agricultural Science, 24*(4), 617-622. https://www.agrojournal.org/24/04-12.pdf

Sharma, S., & Kaur, M. (2017). Plant hormones synthesized by microorganisms and their role in biofertilizer-a review article. *International Journal of Advanced Research, 5*(12), 1753-1762. http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/6144

Shen, Q., Wen, Z., Dong, Y., Li, H., Miao, Y., & Shen, J. (2018). The responses of root morphology and phosphorus-mobilizing exudations in wheat to increasing shoot phosphorus concentration. *AoB Plants, 10*(5), 54. https://doi.org/10.1093/aobpla/ply054

Silitonga, N., Sembiring, M., Marbun, P., & Rosneli, I. (2018). Application of phosphate solubilizing fungi and various sources of P-fertilizers toward P-available and P nutrient content of soybean (*Glycine max* L. Merrill) in andisol soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 260*, 012159. https://doi.org/10.1088/1755-1315/260/1/012159

Solano, J., Mathias, M., Esnault, F., & Brabant, P. (2013). Genetic diversity among native varieties and commercial cultivars of *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L. present in Chile. *Electronic Journal of Biotechnology, 16*(6), 8-18. http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue6-fulltext-15

Sun, X., Wang, N., Li, P., Jiang., Z., Liu, X., Wang, M., Su, Z., Zhang, C., Lin, F., & Liang, Y. (2019). Endophytic fungus *Falciphora oryzae* promotes lateral root growth by producing indole derivatives after sensing plant signals. *Plant Cell and Environment, 43*(2), 358-373. https://doi.org/10.1111/pce.13667

Tabatabai, M., & Bremmer, J. (1969). Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemestry, 1*(4), 301-307. https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1

Toscano-Verduzco, F., Cedeño-Valdivia, P., Chan-Cupul, W., Hernandez-Ortega, H., Ruiz-Sánchez, E., Galindo-Velasco, E., & Cruz-Crespo, E. (2020). Phosphate solubilization, indol-3-acetic acid and siderophores production by *Beauveria brogniartii* and its effect on growth and fruit quality of *Capsicum chinense*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 95*(2), 1-12. https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1662737

Vance, C. P., Uhde-Stone, C., & Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist, 157*(3), 423-447. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x