

FIJACION DE N₂ EN MANI FERTILIZADO CON P Y Ca EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Vicente Arturo Michelena; Aníbal Mata y Fernando Pino.*

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la efectividad de la cepa de *Bradyrhizobium* sp. TAL-1000 y varias dosis de fósforo y calcio en la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico en maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Americano Chico, se estableció un ensayo en condiciones de invernadero. El diseño experimental utilizado fue central rotatable con dos repeticiones y trece tratamientos: 0, 15, 50, 85 y 100 kg ha⁻¹ de fósforo y de calcio e inoculación con la cepa de *Bradyrhizobium* sp. TAL-1000. Se determinó el contenido de clorofila (a + b) en las hojas inferiores, medias y superiores, el peso seco y el nitrógeno de las hojas, del tallo, de la raíz y de los nódulos, el nitrógeno total de la planta y el porcentaje de fósforo en las hojas, tallos, raíz y fósforo edáfico. Los resultados señalan diferencias significativas en el contenido de clorofila (a + b) para las hojas inferiores, medias y superiores. No hubo significancia en forma lineal para el fósforo en las hojas inferiores, ni para el calcio en el peso seco de los nódulos. Para el nitrógeno total de la planta los análisis señalan diferencias significativas en forma lineal y cuadrática para el fósforo. Se reportan diferencias significativas en el porcentaje de fósforo para las hojas, tallos y raíz.

PALABRAS CLAVES: *Arachis*, *Bradyrhizobium*, fósforo.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the efficiency of the *Bradyrhizobium* sp. strain TAL-1000 and several doses of phosphorus and calcium on the

symbiotic fixation of atmospheric nitrogen in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) cv. Americano Chico under greenhouse conditions. The experimental design was a Central Composite Design with two replications and thirteen treatments: 0, 15, 50, 85 and 100 kg ha⁻¹ of phosphorus and calcium, and inoculation with the *Bradyrhizobium* sp. TAL-1000 strain. The following data were measured: chlorophyll (a + b) content in lower, medium and upper leaves; dry weight and nitrogen in leaves, stalk, root and nodules; total nitrogen content in the plant; and percentage of phosphorus in leaves, stalks and root. The results show significant differences in the chlorophyll (a + b) content in lower, medium and upper leaves. No significant differences in linear form were found for phosphorus in lower leaves, nor for calcium or nodule dry weight. For total nitrogen content in the plant, analyses show significant differences in linear and quadratic form for phosphorus. Significant differences are reported in the percentage of phosphorus for leaves, stalks and root.

KEY WORDS: *Arachis*, *Bradyrhizobium*, phosphorus.

INTRODUCCION

El maní constituye uno de los principales cultivos que ofrece magníficas perspectivas para ser explotado económicamente en las condiciones ecológicas de sabana.

Los suelos tropicales presentan, generalmente, un marcado déficit de nitrógeno. Además, por ser suelos livianos no son los más adecuados para el uso de fertilizantes sintéticos nitrogenados, ya que con las lluvias desaparece el 40% del nitrógeno aportado y los agentes químicos son lavados y depositados en los cursos de agua, contaminándolos. Esto, aunado a los notables incrementos de precios que han experimentado los fertilizantes químicos, y el aumento en la estructura de costos de producción de la mayoría de los rubros agrícolas, enfatiza la necesidad de explotar la ventaja que representan las leguminosas, como lo es el poder ser fertilizadas con elementos naturales, económicos y altamente beneficiosos para el suelo a través de la inoculación con

*Postgrado en Agricultura Tropical. Universidad de Oriente. Campus Juanico, Maturín, Venezuela.

rizobios (People *et al.*, 1995). El maní es capaz de producir mayor rendimiento de frutos, con un alto contenido de proteínas, si es inoculado con la cepa apropiada de *Bradyrhizobium* (Michelena, 1982). En el presente trabajo se evalúan varias dosis de fósforo y de calcio en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico y el potencial real de la cepa de *Bradyrhizobium* sp. TAL-1000 como fuente de suministro de nitrógeno al cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) en un suelo virgen de sabana del Estado Monagas.

MATERIALES Y METODOS

El suelo, un Ultisol de sabana de la Estación Biológica de la Universidad de Oriente, en Jusepín, Monagas, se esterilizó en estufa a 100°C. y se dividió en porciones de 1,35 kg, se dispuso en porrones de 1,50 kg de capacidad los cuales se colocaron en una gradilla, de tal forma que la base de los mismos quedase suspendida para evitar posibles contaminaciones. Se usó semillas de maní cv. Americano chico, seleccionadas por homogeneidad en cuanto a tamaño y aspecto. Se desinfectaron superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 5% (p/v) durante 5 minutos y se lavaron posteriormente con abundante agua destilada. Las semillas se germinaron en vermiculita (esterilizada en autoclave), durante tres días en la oscuridad a temperatura ambiente. Se fertilizó el suelo con NaH₂PO₄·H₂O como fuente de fósforo y con CaCO₃ como fuente de calcio en las dosis de 0, 15, 50, 85 y 100 kg ha⁻¹, respectivamente. Se añadió KCl (100 kg ha⁻¹) en forma uniforme, a todos los tratamientos. La cepa liofilizada de *Bradyrhizobium* sp. TAL-1000 se reactivó en una solución de levadura - manitol. Las semillas germinadas se inocularon y se sembraron dos por porrón. Se empleó el diseño central rotatable con dos variables, trece tratamientos y dos repeticiones, para un total de 26 parcelas por experimento. Se raleó a los 10 días, dejando una planta por porrón y se cosechó cuando las plantas alcanzaron aproximadamente el 50% de floración, a los 45 días después de la germinación. Se determinó la concentración de clorofila (a + b) en etanol al 95%, en las hojas inferiores, medias y superiores, mediante el método de Wintermans y de Moots (1965). A la parte aérea se le separaron las hojas del tallo y se estimó el peso seco de la raíz, de los nódulos, de las hojas y del tallo. Los valores de nitrógeno de la parte aérea, de la raíz y de los nódulos se determinaron por micro-Kjeldahl, de acuerdo al sistema Kjeldahl II (Kjeldahl System 1.004, Distilling Unit Tecator).

Los valores de fósforo de las hojas, del tallo y de la raíz se determinaron por preparación de extracto, y apli-

cación de la fórmula: % P(tejido vegetal) = 0,96 - 0,48 log % T (660 nm) (Alcoba, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se reportan tan solo los datos y algunas gráficas de los parámetros donde hubo significancia estadística.

Concentración de Clorofila total (a + b): En la representación tridimensional de la concentración de clorofila (a + b) (Fig. 1) se observa que al aumentar las dosis de fósforo se produce una disminución en la concentración de clorofila total (a + b), mientras que al aumentar las dosis de calcio hay un incremento en la concentración de la misma, no existiendo significancia para calcio en forma cuadrática. La máxima respuesta se obtiene con 15 kg de P ha⁻¹ y 100 kg de Ca ha⁻¹. En este tipo de experimento es muy difícil separar el efecto del pH del suelo de la acción concomitante de otros elementos. La influencia positiva del Ca en aumentar la clorofila posiblemente esté asociada a disminución de la acción tóxica del Al o el Mn y a la deficiencia de P (Cedeño y García, 1981), y éstas son variables de cada suelo que deben ser estudiadas para cada caso en particular incluyendo a las cepas de rizobios.

Peso Seco de las Hojas, de los Tallos y de las Raíces: Los análisis de varianza indican diferencias significativas en los términos lineales y cuadráticos para fósforo y calcio, así como en la interacción de ambos elementos en el peso seco de las hojas, de los tallos y las raíces. El

$$y = 4,91 + 2,1 \times 10^{-2}P - 1,4 \times 10^{-2}Ca - 2,6 \times 10^{-4}P^2 + 5,7 \times 10^{-3}Ca^2 + 3,2 \times 10^{-4}PCa$$

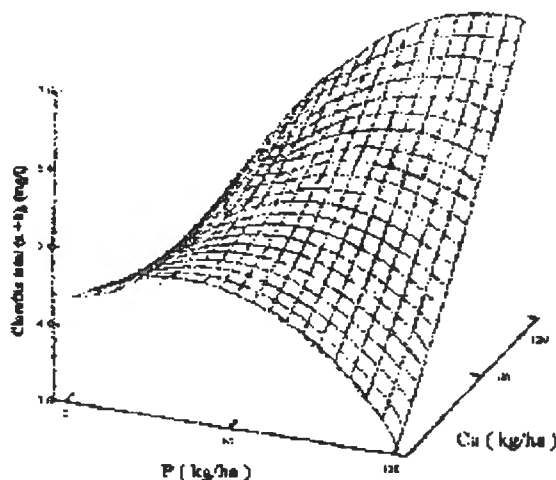


Fig. 1. Representación tridimensional de clorofila total (a + b) en

efecto independiente del fósforo o en combinación con otros nutrientes esenciales, en el incremento de la biomasa foliar en maní y otros cultivos ha sido reportada ampliamente por otros investigadores (Dilworth, 1974; Ayala, 1977; Cassman *et al.* 1981; Gibson *et al.*, 1982; Alcoba, 1995; Bossio, 1995; Giller y Cadisch, 1995). De manera genérica se puede señalar que cuando se elevan los niveles de P y de Ca, la tendencia es producir los máximos rendimientos en peso de hojas de tallos y de raíces.

Peso Seco de los Nódulos: En la Fig. 2 se muestra la representación tridimensional del peso seco de los nódulos. Se evidencia que al aumentar las dosis de fósforo y de calcio hay un incremento inicial en forma lineal, pero posteriormente hay una disminución en el peso seco de los nódulos. La máxima respuesta se obtiene con 50 kg de P ha⁻¹ y 50 kg de Ca ha⁻¹. La existencia de efectos cuadráticos negativos tanto para el P como para el Ca produce una tendencia a disminuir la variable dependiente cuando se elevan los niveles de P o Ca. La acción del efecto cuadrático fue superior a la del lineal, de allí que la tendencia general fue disminuir el peso seco de los nódulos a medida que se elevaban los niveles de P y de Ca.

$$y = -3,8 \times 10^{-2} + 2,9 \times 10^{-3}P + 1,7 \times 10^{-3}Ca - 2,7 \times 10^{-3}P^2 - 1,9 \times 10^{-5}Ca^2 + 6,1 \times 10^{-6}PCa$$

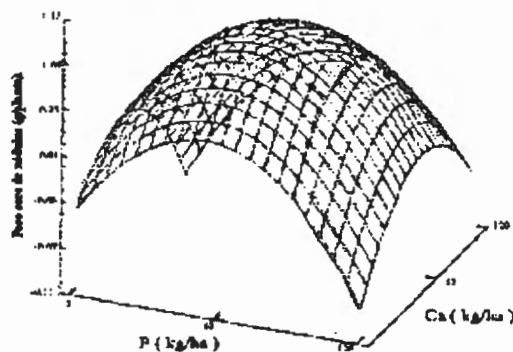


Fig. 2. Representación tridimensional del peso seco (g/planta) de nódulo de plantas de maní Cv. Americano chico, inoculado con la cepa TAL-1000 y fertilizado con fósforo y calcio en condiciones de invernadero.

Peso Seco total de Biomasa: Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en forma lineal, cuadrática y en la interacción de P y Ca en el peso seco total de biomasa. En la Fig. 3 se evidencia un aumento inicial y posteriormente una disminución del peso seco total de

biomasa al incrementar la disponibilidad de P. Por otra parte, a medida que se aumenta el nivel de Ca hay mayor biomasa seca. Sin embargo Alcoba (1995) y Bossio (1995) reportan incrementos en el peso seco total de biomasa cuando aumentaron la dosis de P en maní cv. Americano chico, inoculado con TAL-1000.

$$y = 1,72 + 5,4 \times 10^{-2}P + 4,1 \times 10^{-3}Ca - 4,7 \times 10^{-4}P^2 - 1,0 \times 10^{-4}Ca^2 + 1,6 \times 10^{-4}PCa$$

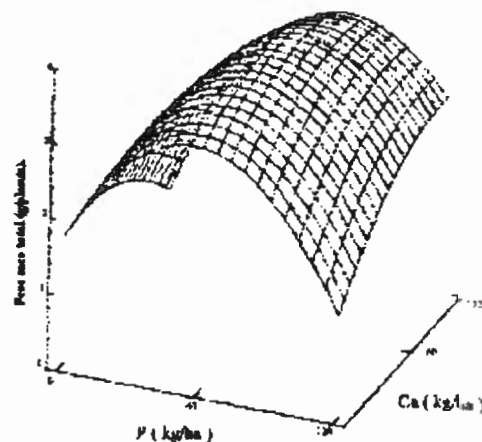


Fig. 3. Representación tridimensional del peso seco total (g/planta) de plantas de maní Cv. Americano chico, inoculado con la cepa TAL-1000 y fertilizado con fósforo y calcio en condiciones de invernadero.

Porcentaje de Nitrógeno en los Nódulos: Al aumentar las dosis de calcio y disminuir las de fósforo, se produce un incremento en el porcentaje de nitrógeno de los nódulos (Fig. 4). La máxima respuesta se obtiene con 100 kg de Ca ha⁻¹ y sin aplicación de fósforo. Sin embargo, el fósforo comienza a incrementar teóricamente el porcentaje de nitrógeno en los nódulos en dosis superiores a las aplicadas en este ensayo. Un efecto similar se observó cuando se analizó la concentración de clorofila total (a + b). Este efecto benéfico del Ca posiblemente se deba a una mejora en las condiciones químicas del suelo. Bajo pH generalmente reduce la nodulación. Al aumentar el pH se incrementa la disponibilidad de Mo en el suelo y se reduce la solubilidad y por ende la absorción de algunos microelementos catiónicos como Al y Mn que en exceso son tóxicos para las plantas (Date y Halliday, 1979; Pino, 1994).

Nitrógeno total de la Planta: En la Fig. 5 se muestra la representación tridimensional del nitrógeno total al inocular con la cepa TAL-1000. Al aumentar las dosis de fósforo se produce un incremento del nitrógeno total,

$$y = 9,19 - 0,11P - 5,8 \times 10^{-2}Ca + 6,2 \times 10^{-4}P^2 + 5,2 \times 10^{-4}Ca^2 + 2,3 \times 10^{-4}PCa$$

$$y = 57,93 - 0,44P + 1,08Ca + 3,1 \times 10^{-4}P^2 - 1 \times 10^{-2}Ca^2 + 8 \times 10^{-3}PCa$$

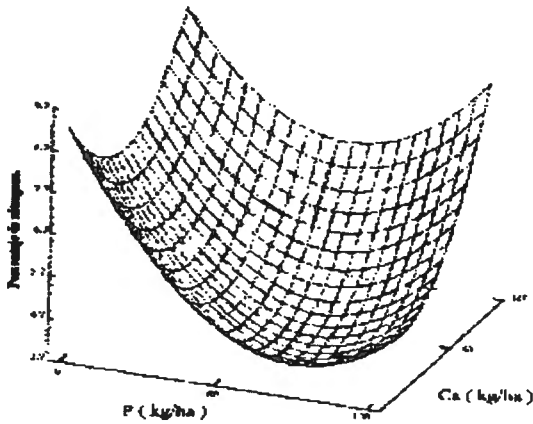


Fig. 4. Representación tridimensional del porcentaje de nitrógeno de nódulos de plantas de maní Cv. Americano chico, inoculado con la cepa TAL-1000 y fertilizado con fósforo y calcio en condiciones de invernadero.

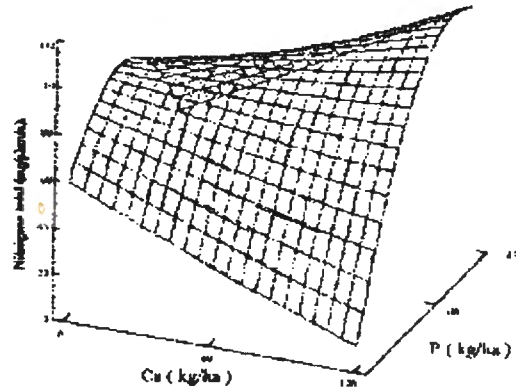


Fig. 5. Representación tridimensional del nitrógeno total (mg/planta) de plantas de maní Cv. Americano chico, inoculado con la cepa TAL-1000 y fertilizado con fósforo y calcio en condiciones de invernadero.

mientras que al aumentar las dosis de calcio se produce una disminución. La máxima respuesta se obtiene con 100 kg de P ha⁻¹ y sin aplicación de calcio. El efecto del P en incrementar el nitrógeno en las plantas es reportado en la literatura científica (Ayala, 1977; Alcoba, 1995; Bossio, 1995; Giller y Cadisch, 1995), y es un hecho muy importante desde el punto de vista agronómico, puesto que la experiencia señala que la cantidad de nitrógeno fijado por una asociación simbiótica, se correlaciona fuertemente con la disponibilidad de uso de P por la planta. El rol jugado por el fósforo en las reacciones energéticas de la planta, y más específicamente, el del ATP en la actividad de la nitrogenasa, sugiere que las plantas que dependen de la fijación simbiótica para su crecimiento, requieren más fósforo que aquellas que dependen de nitrógeno edáfico (Cassman *et al*, 1980).

Porcentaje de fósforo total en el follaje: Al analizar el porcentaje de fósforo total cuando se inoculó con la cepa TAL- 1000, no existe significancia estadística en forma cuadrática para el calcio, pero sí en forma lineal. Al no presentar interacción, los dos elementos actúan con pendientes propias de la acción de cada elemento por sí mismo. Para el P se detectaron significancias en los efectos lineales, cuadráticos y en la interacción. En la Fig. 6 se muestra la representación tridimensional del porcentaje de fósforo total al inocular con la cepa TAL-1000. Se puede señalar que al aumentar los niveles de fósforo y de calcio edáficos la tendencia es incrementar al máximo el fósforo del follaje.

$$y = 0,17 - 5,7 \times 10^{-4}P - 8,6 \times 10^{-4}Ca + 1,3 \times 10^{-5}P^2 - 2,9 \times 10^{-2} + 7,1 \times 10^{-6}PCa$$

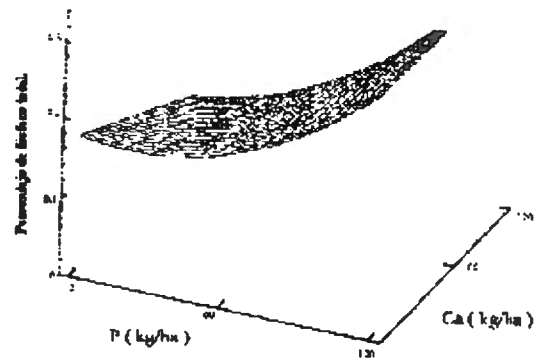


Fig. 6. Representación tridimensional del porcentaje de fósforo total de plantas de maní Cv. Americano chico, inoculado con la cepa TAL-1000 y fertilizado con fósforo y calcio en condiciones de invernadero.

CONCLUSIONES

Una de las ventajas del Diseño Central Rotable es que permite la obtención de una función fácilmente derivable con la cual se puede determinar la variación de un proceso a cualquier nivel de la variable independiente. Este diseño se ha usado preferentemente cuando se desea

conocer el comportamiento económico de un parámetro. Sin embargo, no siempre se llega al nivel económico, sino que el investigador queda satisfecho con la obtención de la función de producción. Con el cálculo de la ecuación de predicción multivariada se puede conocer la superficie de respuesta para cada uno de los parámetros medidos. Las gráficas tridimensionales son la representación teórica, determinada matemáticamente de un proceso que está sometido a un error, pero en este tipo de graficación no es posible incluir los valores empíricos obtenidos en el experimento, tal como se hace con las representaciones gráficas bidimensionales. Esto, por supuesto, es una desventaja de este tipo de gráfico.

En este trabajo se usó el Diseño Central Rotable para cuantificar la respuesta del maní cv. Americano Chico, al ser inoculado con la cepa de *Bradyrhizobium* sp. TAL-1000 y fertilizado con fósforo y calcio en condiciones de invernadero.

Cuando la variable estudiada fue la concentración de clorofila ($a + b$) en las hojas, se observó una tendencia del P a disminuir los niveles de clorofila, en tanto que el Ca incrementaba la clorofila en las hojas. Similar respuesta se obtuvo cuando se analizó el porcentaje de nitrógeno en los nódulos.

La interacción del P y del Ca aumentaron significativamente los pesos secos de las hojas, de los tallos y de las raíces y la tendencia fue de aumentar el peso seco cuando se elevan los niveles de P y de Ca. Sin embargo, se evidenciaron efectos cuadráticos negativos tanto para P como para Ca en la variable dependiente peso seco de nódulos.

Se detectaron diferencias estadísticas significativas en forma lineal, cuadrática y en la interacción de P y Ca en el peso seco total de biomasa.

Al aumentar las dosis de P se produce un incremento en el nitrógeno total, mientras que al aumentar las dosis de Ca se produce una disminución.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento del Proyecto CI-3-0601-0195 / 82-95, gracias al cual fue posible la realización de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALCOBA, A. 1995. Efecto de la fertilización edáfica con P y K sobre la fijación simbiótica de nitrógeno y el rendimiento del maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Americano Chico en condiciones de invernadero. Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. Maturín. Venezuela. 208 p.
- AYALA, L. 1977. Estudio de algunos aspectos de la fijación simbiótica de nitrógeno por el maní (*Arachis hypogaea* L.) II. Evaluación bioquímica de la fijación y factores relacionados en la asociación maní-Rhizobium spp. Agron. Trp. 27: 427-229.
- BOSSIO, J. 1995. Efecto de la fertilización edáfica con P y Mo sobre la fijación simbiótica del nitrógeno y el rendimiento del maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Americano Chico en condiciones de invernadero. Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. Maturín. Venezuela. 240 p.
- CASSMAN, K.G., WHITNEY, A.S. y FOX, R.L. 1981. Phosphorus requirements of soybean and cowpea as affected by mode of N-nutrition. Agric. J. 73: 17-22.
- CEDEÑO, Z. y GARCIA, L. 1981. Efecto de diferentes dosis de cal agrícola y de fósforo sobre la producción de dos cultivares de soya (*Glycine max* (L.) Merr.) en un ultisol de sabana. Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. Jusepín. Monagas. Venezuela. 45 p.
- DATE, R.A. y HALLIDAY, J. 1979. Selected *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. Nature 277 (5691): 62-64.
- DILWORTH, M. J. 1974. Dinitrogen fixation. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 81 - 114.
- GIBSON, A.H., B.L. DREYFUS y Y. R. DOMMERGUES. 1982. Nitrogen fixation by legumes in the tropic. Developments in Plant and Soil Sciences. Boston. Martinus Nijhoff. Vol. 5: 328 p.
- GILLER, K.E. y CADISCH, G. 1995. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. Plant and Soil 174: 255-277.

- MICHELENA, V.A. 1982. Fijación de Nitrógeno por seis cepas de *Rhizobium* en cuatro cultivares de maní (*Arachis hypogaea* L.). Memorias de la XI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Lima. Perú. pg. 183.
- PEOPLES, M.B., HERRIDGE, D.F. y LADHA, J.K. 1995. Biological Nitrogen Fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*. 174: 3-28.
- PINO, F.B. 1994. Calibración de extractores químicos, isoterma de retención, diagrama de solubilidad y respuesta del maíz y la soya a la fertilización con algunos microelementos en suelos de la región oriental. Trabajo de Ascenso Titular. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. Maturín. Venezuela. 297 p.
- WINTERMANS, J. y de MOOTS, A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys. Acta*. 109: 448-453.