

Cuantificación mediante el uso de técnicas nucleares de la contribución de la Fijación Biológica de Nitrógeno a la nutrición de variedades cubanas de arroz irrigado

Olegario Muñiz¹; Narovis Rives²; Leonila Fabré²; Miguel Socorro²; Bruno Alves³; Segundo Urquiaga³

¹ Instituto de Suelos, Apdo. 8022, Boyeros, La Habana, Cuba. Teléfono (537) 6451788; e-mail: sccsmuniz@ceniai.inf.cu

² Instituto de Investigaciones del Arroz, Bauta, La Habana, Cuba.

³ EMBRAPA – Agrobiología, CP 74505, Seropédica, RJ, Brasil.

Introducción

A partir de 1996, el Ministerio de la Agricultura de Cuba tomó la decisión de estimular y apoyar la producción del cultivo del arroz (*Oryza sativa* Lin) por pequeños productores, que venía ocurriendo durante varios años, y fue reconocido entonces como Arroz No Especializado (Arroz Popular), la que se realiza a baja escala y con un mínimo de insumos externos. Éste tipo de producción, en la actualidad constituye la mayor parte del arroz producido en Cuba y la totalidad del que se vende en el Mercado Libre a la población a precios razonables. Las dificultades económicas que el país confronta, así como los elevados precios de los fertilizantes minerales en el mercado internacional, obligan al uso más eficiente del mismo y a la vez, a la búsqueda de alternativas con el fin de lograr incrementos en la producción agrícola mediante criterios, tanto económicos como ecológicamente sostenibles. Por otra parte, estudios realizados en otros países, indican que algunas variedades pueden ser beneficiadas en cantidades significativas por la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) realizada por bacterias nativas o autóctonas del suelo, sin la necesidad de su inoculación (Urquiaga *et al.*, 1991).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) por cuatro variedades cubanas de arroz irrigado crecidas en un suelo con bajo contenido de materia orgánica, representativo de los empleados en Cuba en el cultivo del arroz.

Materiales y Métodos

Se evaluaron cuatro variedades cubanas de arroz irrigado, utilizadas actualmente en la producción. Estas fueron: LP-2 (ciclo medio), LP-5, Perla de Cuba y Reforma (ciclo corto), crecidas en un área uniforme de suelo Acrisol Gléyico (Aquic Kandiustalf), caracterizado por valores medios de pH en KCl de 5.40, contenido de Materia Orgánica (M.O.) de 1.00 % (método Walkley y Black) y de P₂O₅ y K₂O asimilables de 6 y 7 mg.100g⁻¹, respectivamente (método Oniani); perteneciente al área experimental ubicada en la Granja Caribe del Complejo Agroindustrial (CAI) Los Palacios, Pinar del Río, Cuba.

El experimento se condujo a inicios del mes de febrero del 2009, en parcelas de 20 m² en las que se sembraron las cuatro variedades anteriormente mencionadas, sin la aplicación del fertilizante nitrogenado (Sin N) y con su aplicación (Con N) a la dosis de 102 kg.ha⁻¹ de N, empleando urea como portador. El mismo se aplicó en tres fracciones iguales, la primera a los 30 días de germinada la semilla y la última en el llenado del grano. En todas las parcelas se aplicaron dosis de 80 kg.ha⁻¹ y 90 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ y K₂O, respectivamente, en la forma de superfosfato triple y cloruro de potasio.

En cada parcela se evaluó el rendimiento de arroz cáscara (14 % de humedad), tomando 3 muestras de 1 m² cada una. Además, de las parcelas Sin N se tomaron 4 muestras de plantas completas (parte aérea) por Variedad de arroz, que fueron divididas en grano y paja y enviadas al laboratorio, donde se secaron a 65 °C y molieron.

Como cultivo de referencia se empleó el sorgo (*Sorghum vulgaris* Lin) de la variedad CIAP Dorado, realizándose paralelamente un ensayo en macetas que contenían 400 g del mismo suelo tomado a la profundidad de 0-10 cm en el área donde se condujo el experimento de campo con arroz. A las macetas se les añadió solamente las cantidades equivalentes del

fertilizante fosfórico y potásico a las empleadas en el experimento con arroz. Se sembraron 6 semillas por maceta y se consideraron cuatro repeticiones. A los 30 días se cosechó la parte aérea y se secó y molió de forma análoga al arroz.

La contribución de la FBN asociada tanto a las variedades de arroz (en el grano) como al sorgo, se evaluó mediante la Técnica de la Abundancia Natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) (Boddey *et al.*, 1995 y 2001), con el auxilio de un espectrómetro de masa Finnigan Mat (modelo Delta plus) de los laboratorios de EMBRAPA-Agrobiología, Seropédica, RJ, Brasil.

La técnica requiere del empleo de especies de referencia (gramíneas) que crezcan en el mismo suelo, usualmente malezas.

De acuerdo a esta técnica se aplica la fórmula:

$$\% \text{ FBN} = \frac{(\delta^{15}\text{N cultivo de referencia} - \delta^{15}\text{N cultivo estudiado})}{(\delta^{15}\text{N cultivo de referencia} - B)} \times 100$$

donde:

$\delta^{15}\text{N}$ del cultivo de referencia: es el valor de $\delta^{15}\text{N}$ del suelo obtenido a través de las malezas.

$\delta^{15}\text{N}$ del cultivo estudiado: es el valor de $\delta^{15}\text{N}$ del cultivo estudiado, el arroz.

B: es el valor de discriminación isotópica de ^{15}N hecho por las plantas durante el proceso de FBN. En este caso se consideró igual a cero (0).

Por otra parte, se realizó una evaluación de la presencia de microorganismos endófitos en las plantas de las diferentes variedades de arroz que les posibilita expresar su capacidad de fijar nitrógeno del aire. Con este fin, en las parcelas en que no se aplicó nitrógeno, se tomaron muestras de plantas a los 60 días de germinado el cultivo. Las plantas se extrajeron con sumo cuidado, conservando el suelo circundante a la raíz. Se colocaron en bolsas de nylon y se trasladaron de inmediato al laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana para su posterior análisis.

En el laboratorio, las plantas se sacudieron ligeramente para eliminar el exceso de suelo y se separaron las partes aéreas de las raíces. Se pesaron 10 g de raíces con suelo adherido y se agitaron vigorosamente en 90 mL de solución fisiológica. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . Las diluciones (100 μL) se sembraron (5 pomos x dilución) en medio semisólido libre de nitrógeno (Wilson y Knight, 1952) y se incubaron a 37°C durante 96 horas. Este método fue utilizado para realizar el conteo de nitrofijadores totales mediante el método del número más probable. De igual manera, las diluciones se sembraron por triplicado en placas de Agar Nutriente para conteo de bacterias totales.

A partir de los pomos con crecimiento, se sembró (por triplicado) en placas de King B (para conteo de *Pseudomonas*), Rojo Congo (para conteo de *Azospirillum*) y Ashby (para conteo de *Azotobacter*) para determinar la presencia de estos géneros en los nitrofijadores encontrados.

Se empleó el test F a 5 % de probabilidad, de acuerdo a un diseño totalmente aleatorizado para comparar las medias de los tratamientos Sin y Con N, en la evaluación del rendimiento de arroz cáscara, para cada variedad.

Resultados y Discusión.

La Tabla 1 muestra los rendimientos de arroz cáscara obtenidos por las 4 variedades de arroz irrigado evaluadas.

Como se observa en la Tabla 1, no hubo respuesta marcada de las variedades a la aplicación del N e incluso, no se encontró para cada variedad, diferencia entre las medias Sin y Con N al aplicar el test F a 5% de probabilidad. Esto denota la existencia de una fuente alternativa del nutriente que fue capaz de suprir parte de su requerimiento, a pesar de que se trata de un suelo con muy bajo contenido de M.O. y por tanto de N. De forma general, los rendimientos pueden ser considerados como aceptables, por tratarse de un suelo muy pobre y degradado, donde los rendimientos históricos del cultivo, no pasan de 4 t.ha⁻¹.

Tabla 1. Rendimiento de arroz cáscara (14 % humedad) obtenido por las 4 variedades de arroz evaluadas ($t.ha^{-1}$), expresado como Media ± Error Estándar.

Tratamiento	$t.ha^{-1}$			
	LP-2	Reforma	Perla de Cuba	LP-5
Sin N	4.46 ± 0.15 a	3.69 ± 0.36 a	3.67 ± 0.25 a	3.64 ± 0.27 a
Con N	5.10 ± 0.19 a	4.40 ± 0.12 a	4.10 ± 0.18 a	4.74 ± 0.63 a

Letras comunes indican la no existencia de diferencias significativas para $p<0.05$

Por otra parte, los valores de $\delta^{15}N$ obtenidos en las variedades de arroz estudiadas (Tabla 2) fueron aceptablemente estables y difieren marcadamente al de la Referencia (sorgo), por lo que el aporte de la FBN a los requerimientos de N de las cuatro variedades de arroz irrigado evaluadas fue significativo.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la evaluación de la contribución de la FBN a la nutrición nitrogenada del cultivo en las variedades de arroz estudiadas, expresados como Media ± desviación estándar.

Variedad	Ciclo	% N total	$\delta^{15}N$	% FBN
LP-2	Medio	1.03±0.088	8.39±0.625	29.45±5.259
Perla de Cuba	Corto	1.11±0.059	8.08±0.761	31.80±6.649
Reforma	Corto	0.99±0.099	8.43±0.419	29.14±3.523
LP-5	Corto	1.11±0.078	8.55±1.002	28.09±8.427
Sorgo (Referencia)	-	2.50±0.07	11.89±1.728	-

Con relación a los resultados obtenidos en la evaluación de los microorganismos endófitos en las muestras, resulta conveniente recordar que como prueba cualitativa presuntiva de la capacidad de los microorganismos para fijar dinitrógeno, se emplea su crecimiento en medio semisólido libre de nitrógeno, lo cual debe corroborarse mediante la medición de la actividad nitrogenasa por la capacidad de reducción del acetileno (ARA) en las cepas aisladas a partir de los pomos positivos.

Especies pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum*, son señaladas en la literatura por su alta frecuencia de aparición en la comunidad endófita de cultivos, como el arroz, así como por poseer una elevada actividad nitrogenasa (Döbereiner *et al.*, 1995).

La actividad nitrogenasa tiene una gran importancia en la agricultura ya que contribuye al aumento de la producción y participa en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en las muestras de suelo analizadas en el experimento, los que concuerdan con los obtenidos en la Tabla 2 y posibilitan su fundamentación.

Resulta evidente el elevado número de bacterias totales obtenido en los conteos asociados a las 4 variedades en estudio. Este comportamiento podría explicarse por las condiciones favorables para el crecimiento de los microorganismos que pudieran existir en los suelos donde se encontraban sembradas estas variedades. En este sentido, diversos autores han demostrado la importancia de diversos factores en la supervivencia y establecimiento de las bacterias en la rizosfera (Hernández *et al.*, 2003).

También se evidencia el hecho, que los microorganismos nitrofijadores totales ocupan un lugar destacado de la población de bacterias totales encontradas, con excepción de la variedad Perla de Cuba, donde fue menor (en el orden de 10^3 UFC x g⁻¹).

Tabla 3. Conteo de nitrofijadores totales y de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (valores medios) en las muestras de suelo rizosférico analizadas.

Determinaciones realizadas (UFC x g ⁻¹ s. r) [*]	LP2	Reforma	Perla de Cuba	LP5
Bacterias totales	1.23 x 10 ⁸	1.40 x 10 ⁸	1.35 x 10 ⁸	6.20 x 10 ⁸
Nitrofijadores totales	8.0 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁴	8.0 x 10 ⁸
<i>Pseudomonas</i> sp.	1.3 x 10 ³	1.5 x 10 ³	2.1 x 10 ³	2.3 x 10 ³
<i>Azospirillum</i> sp.	3.0 x 10 ⁵	2.8 x 10 ⁵	3.0 x 10 ³	4.5 x 10 ⁶
<i>Azotobacter</i> sp.	7.3 x 10 ⁴	6.2 x 10 ⁴	5.2 x 10 ³	7.2 x 10 ⁵

En este trabajo se demuestra que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter* se encuentran asociados al cultivo del arroz en las variedades estudiadas y que desempeñan un importante papel en la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Entre los géneros encontrados se destaca *Azospirillum* por los mayores valores (3.0×10^3 - 4.5×10^6 UFC x g⁻¹), seguido por los géneros *Azotobacter* (5.2×10^3 - 7.2×10^5 UFC x g⁻¹) y *Pseudomonas* (1.3 - 2.3×10^3 UFC x g⁻¹).

La valoración general de los resultados, permite considerar que los mismos están relacionados con el muy bajo contenido (1.0 %) de materia orgánica (M.O) del suelo y el consiguiente bajo contenido de N en el mismo, lo que posibilita la acción de estos mecanismos de fijación biológica, que como se conoce son energéticamente exigentes. De tal forma que en estas condiciones, las cuatro variedades estudiadas, se favorecieron del proceso de FBN.

Resulta importante enfatizar, que este proceso es posible solamente en suelos con estas características. En un trabajo anterior, Muñiz *et al.* (2008), empleando muestras tomadas en áreas de la producción, evidenció que si bien en variedades cultivadas en suelos con contenidos de 1.70 % de M.O., el cultivo fue favorecido por la FBN, aunque no en la magnitud obtenida en el presente trabajo; en suelos con contenidos de M.O. de 2.40 % o mayores, el proceso se minimiza de forma notable o no ocurre, en dependencia de la variedad de arroz irrigada evaluada.

Resulta por tanto evidente, que la FBN es una potencial fuente que permite suplir parcialmente los requerimientos de N en el cultivo de arroz irrigado.

Llama la atención que Muñiz y Beltrán (1996), al estudiar la aplicación diferenciada del fertilizante nitrogenado (urea) al arroz irrigado, variedad J-104, de acuerdo al contenido de M.O del suelo, señalan que en aquellos suelos con contenido de M.O por debajo de 1.8 %, la respuesta a la fertilización nitrogenada parece indicar la existencia de otra fuente de nitrógeno diferente al nativo del suelo y al aplicado con el fertilizante químico. Los resultados encontrados en el presente estudio, lo confirman.

Resultados que, además, son de importancia para la producción, ya que el 74 % de los suelos dedicados al cultivo del arroz conocido como Especializado, presentan valores de contenido de M.O. tan o más bajos que los del presente estudio (Ojeda *et al.*, 2000).

Todos estos resultados confirman los obtenidos por Embrapa Agrobiología que demuestran que la FBN puede contribuir sensiblemente a la nutrición nitrogenada del cultivo del arroz irrigado en Brasil, y con buenas perspectivas de optimizarlo a través del uso de variedades de ciclo intermedio y del mejoramiento genético de plantas (Urquiaga *et al.*, 1991; Campos *et al.*, 1995 y 2003).

Agradecimientos

Los autores agradecen a la TWAS-UNESCO así como al CNPq y a EMBRAPA-Agrobiología, estos dos últimos de Brasil, por el financiamiento parcial de la investigación.

Referencias bibliográficas

- Boddey, R.M.; O.C. De Oliveira; S. Urquiaga; V. Reis; F.L. Olivares; V.L.D. Baldani & J. Döbereiner. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil.* 174:195-209. 1995
- Boddey, R.M.; J.C. Polidoro; A.S. Resende; B.J.R Alves & S. Urquiaga. Use of the ¹⁵N Natural Abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:889-895. 2001
- Campos, D.V.B.; A.S. Resende; S. Urquiaga; B.J.R. Alves & R.M. Boddey. Identification of wetland rice genotypes with potential for biological nitrogen fixation. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics. The Role of Biological Nitrogen Fixation. Abstracts. Angra dos Reis, RJ. p. 242-243. 1995
- Campos, D.V.B.; A.S. Resende; B.J.R. Alves; R.M. Boddey & S. Urquiaga. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sub inundação. *Agronomia.* 37:41-46. 2003
- Döbereiner, J., V. L. D. Baldani y V. M. Reis. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In *Azospirillum VI and related microorganisms.* Eds. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden y M. de Zamaroczy. pp 3-14. Springer Verlag, Berlin, Germany. 1995
- Hernández, A.; A. Caballeros; M. Pazos; R. Ramírez y M. Heydrich. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mayz* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología.* V-(1):45-55. 2003
- Muñiz, O. & R. Beltrán. Fertilización diferenciada nitrogenada del arroz, Variedad J-104. En: IV Jornada Científica del Instituto de Suelos, La Habana. 1996.
- Muñiz, O.; N. Rives; R. Castro; R. Sanzo; M. Socorro; B. Alves & S. Urquiaga. Evaluación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno por variedades cubanas de arroz irrigado en dos tipos de suelo. *Revista Cubana del Arroz.* 10:50-57. 2008
- Ojeda, A.; R. Cancio; V. Moreno; A. Fernández y O. Muñiz. 20 años de eficiencia del Servicio Agroquímico en el cultivo del arroz. *Revista Cubana del Arroz.* 2: 35-42. 2000
- Urquiaga S.; H.F. Lopes; F.O. Quintero, F.O.; R.M. Boddey & J. Döbereiner, J. Identificação de genótipos de arroz inundado com sistema de fixação eficiente. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, XXIII, Porto Alegre. Soc. Bras. Ciencia do Solo. p.86. Resumo No. 57. 1991
- Wilson, P.W. and S.C. Knight. Experiments in bacterial physiology. Burgee, Minneapolis, USA, p.149. 1952