

ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO DE LA *Canavalia ensiformis* POR EL MÉTODO DE LA DIFERENCIA DE N TOTAL

Gloria M. Martín[✉], R. A. Rivera y Yonaisy Mujica

ABSTRACT. For the full use of the biological nitrogen fixation (BNF) benefits in agriculture, it is necessary to calculate the quantity of N fixed by plant-microorganism systems under different field conditions. *Canavalia ensiformis* is a very useful legume as a green manure. Diverse methodologies exist to quantify and/or evaluate BNF based mainly on the increment of dry matter production, differences in the total yield of N, nodulation, xylem solutes, enzymatic activity (acetylene reduction) and the use of ¹⁵N. The present work was carried out mainly to quantify the biological nitrogen fixation of *Canavalia ensiformis* by means of the total difference of N method in the soil-plant system. The experiment was developed in the department of Agricultural Services of INCA, on a lixiviated Red Ferralitic soil with N availability of 26.8 kg.ha⁻¹. *Canavalia* was sowed in May, 2006 at the beginning of the rainy season using corn as a reference crop; a random block design was used with four replications. The growth in both species was good, despite the low initial N content in the soil, observing statistically significant differences in N concentration. Besides, nitrogen content is much higher in *canavalia*, which is in correspondence with nitrogen concentrations in each organ. On the other hand, it was observed that the biological nitrogen fixation of *canavalia* was of the order of 62.84 %, equivalent to 81.77 kg N.ha⁻¹.

RESUMEN. Para el pleno aprovechamiento de los beneficios de la fijación biológica del nitrógeno en la agricultura, es preciso calcular la cantidad de N que se fija por los sistemas planta-microorganismo en diferentes condiciones de campo. La *Canavalia ensiformis* es una leguminosa de gran uso como abono verde. Existen diversas metodologías para cuantificar y/o evaluar FBN basados principalmente en el incremento de la producción de materia seca, diferencias en el rendimiento de N total, nodulación, solutos en el xilema, actividad enzimática (reducción del acetileno) y utilización del ¹⁵N. El presente trabajo se realizó teniendo como objetivo principal cuantificar la fijación biológica del nitrógeno de la *Canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de N total del sistema suelo-planta. El experimento se desarrolló en el departamento de Servicios Agrícolas del INCA, sobre un suelo Ferralítico Rojo lixiviado con una disponibilidad para los cultivos de 26.8 kg N.ha⁻¹. La *canavalia* se sembró en mayo del 2006, al inicio de la época de lluvias y como cultivo de referencia se empleó el maíz; el diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro réplicas. A pesar del bajo contenido inicial de nitrógeno en el suelo, el crecimiento en ambas especies fue bueno, observándose diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de N. Además, se pudo apreciar que el contenido de nitrógeno fue más alto en la *canavalia*, lo cual estuvo en correspondencia con las concentraciones de nitrógeno en cada órgano. Por otra parte, se observó que la fijación biológica de nitrógeno de la *canavalia* fue del orden del 62.84 %, equivalente a 81.77 kg N.ha⁻¹.

Key words: *Canavalia*, nitrogen fixation, green manures

Palabras clave: *Canavalia*, fijación del nitrógeno, abonos verdes

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es uno de los procesos de mayor importancia en la naturaleza, pues representa la utilización de un gas inerte como fuente para un grupo de microorganismos; el N así fijado puede ser utilizado directa o indirectamente por plantas de interés agrícola y forestal, a través de su simbiosis con los

microorganismos nitro fijadores y constituye el mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por los procesos microbianos de nitrificación, desnitrificación y volatilización del amoníaco (1).

Una forma sostenible de incorporar N a los sistemas agrícolas es la inserción dentro de la rotación de cultivos, de plantas en simbiosis con microorganismos capaces de realizar la FBN. Entre estos tipos de plantas, las leguminosas empleadas como abono verde reúnen varias ventajas, pues además del aporte considerable de nitrógeno que realizan, también son capaces de reciclar otros nutrientes y mejorar algunas propiedades físicas y biológicas de los suelos (2).

Ms.C. Gloria M. Martín, Investigador Agregado; Dr.C. R. Rivera, Investigador Titular y Yonaisy Mujica, Reserva Científica del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, la Habana, Cuba CP 32 700.

✉ gloriam@inca.edu.cu

En las condiciones de Cuba, una de las especies de abono verde con la que mejores resultados se han obtenido es la *Canavalia ensiformis*, capaz de aportar más de 150 kg N.ha⁻¹ y hasta 5 t.ha⁻¹ de masa seca, además de elevar sosteniblemente los rendimientos de cultivos tan diversos como maíz, papa, calabaza, malanga, entre otros (3).

Para el pleno aprovechamiento de los beneficios de la FBN, es preciso calcular la cantidad de nitrógeno que se fija por los sistemas planta-microorganismo en diferentes condiciones de campo. Es un requisito indispensable disponer de un método adecuado, para medir con precisión la cantidad de nitrógeno que las plantas obtienen por este proceso simbiótico (4).

Existen diversas metodologías para cuantificar y/o evaluar la FBN, basadas principalmente en el incremento de la producción de materia seca, diferencias en el rendimiento de N total, nodulación, solutos en el xilema, actividad enzimática (reducción del acetileno) y utilización del ¹⁵N, cada una de ellas con ventajas y también algunas limitantes, por lo que la selección del método para medir la FBN depende básicamente del objetivo experimental, ya que no existe una técnica simple y exacta.

La técnica de diferencias en el rendimiento de N total es laboriosa, ya que cuantifica el porcentaje de nitrógeno en plantas fijadoras y no fijadoras (cultivos de referencia); adicionalmente, se debe tener la precaución en la selección de la planta de referencia, ya que se asume que ambos tipos de plantas deben absorber cantidades similares del nitrógeno proveniente del suelo (5).

El presente trabajo se realizó teniendo como objetivo principal cuantificar la FBN de la *Canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de N total (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el departamento de Servicios Agrícolas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado a 138 m snm. El suelo se clasifica como Ferralítico Rojo lixiviado, según la Nueva versión de clasificación de los suelos de Cuba (7), que se correlaciona con un Nitisol Ródico Éutrico de la WRB (8).

El suelo presentó un pH de 7.25, bajo contenido de materia orgánica (1.34 %) y un alto contenido de fósforo (430.75 mg.kg⁻¹). El contenido de los cationes Ca, Mg, K y Na fue de 12.03; 3.60; 0.64 y 0.05 cmol.kg⁻¹ respectivamente.

Es necesario destacar que el suelo presenta el principal requisito para poder aplicar el método de la diferencia de N total y es que posee bajo contenido de N disponible para las plantas (6); en este caso, cada 1 % de materia orgánica de un suelo equivale a 20 kg N disponible.ha⁻¹ para cultivos de ciclo corto (9), por lo que se puede plantear que el suelo empleado tiene una disponibilidad de N para los cultivos de 26.8 kg N.ha⁻¹.

Cuantificación de la FBN. Se realizó por el método de la diferencia de N total del sistema suelo-planta. El principio de la técnica se basa en cultivar una planta de refe-

rencia (no fijadora) al mismo tiempo e iguales condiciones que la planta fijadora, ambas en medios empobrecidos o libres de N, así las únicas fuentes disponibles del elemento son la propia semilla, el aire y el suelo (5). Se compara el N total acumulado por la planta fijadora con el N total acumulado por la planta control, no fijadora, y la diferencia es considerada como el N derivado de la FBN (6).

Es necesario añadir que en los cálculos se tuvo en cuenta la cantidad de N presente en la semilla de cada especie pues, sobre todo en leguminosas, la semilla constituye la principal fuente inicial de N para la planta. En el caso de canavalia se informa que puede poseer entre 46 y 120 mg N. semilla⁻¹ (6, 10).

Procedimiento para el manejo de la canavalia y la planta de referencia. La *Canavalia ensiformis* se sembró de forma manual, utilizando altas densidades (0.45 m entre hileras y 0.10 m entre plantas) en mayo de 2006, inmediatamente después de comenzadas las primeras precipitaciones de la estación de lluvias.

Durante el período de crecimiento vegetativo del abono verde, fue necesaria la limpieza manual del campo para la eliminación de arvenses. Esta labor se realizó hasta que la canavalia formó una cobertura total en el campo.

Como cultivo de referencia se empleó el maíz, distribuido en varias parcelas de forma aleatoria entre las parcelas de canavalia. Se sembró con una distancia entre surcos de 0.90 m y entre plantas de 0.30 m, y se le realizaron las mismas labores culturales que a la canavalia. El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro réplicas.

Determinaciones realizadas

★ Muestreo de plantas completas

Se realizó en el momento de incorporación de las plantas para ser utilizadas como abono verde, a los 60 días después de la germinación. Se tomaron todas las plantas crecidas en un metro lineal en el centro de cada parcela experimental, tanto del abono verde como del maíz.

★ Masa seca

Se determinó secando en estufa, a 70°C durante 10 días, las plantas analizadas, separando los tallos y las hojas.

★ Análisis de N

El contenido de N (%) en la parte aérea y semillas se determinó por digestión húmeda con H₂SO₄+Se y determinación colorimétrica con el reactivo de Nessler, y el contenido de N se calculó a partir de los datos de la masa seca de cada órgano y la correspondiente concentración del elemento, utilizándose la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de N (g.planta}^{-1}\text{)} = [\text{masa seca (g) x \% N en cada órgano}] / 100$$

★ Cuantificación de la FBN.

Se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{FBN} = \frac{(\text{contenidoN fix} - \text{contenidoN semillafix}) - (\text{contenidoN control} - \text{contenidoN semillacontrol})}{(\text{contenidoN fix} - \text{contenidoN semillafix})} \times 100$$

donde: fix = planta fijadora

control = planta no fijadora

Procedimiento estadístico. Los resultados de las evaluaciones fueron procesados de acuerdo al diseño experimental utilizado; se procedió a realizar un análisis de varianza a los datos y posteriormente las medias de los tratamientos fueron comparadas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$), empleando el programa Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se puede observar el crecimiento efectuado por la canavalia y el maíz en las condiciones experimentales en las que se desarrollaron, así como la concentración de N por órganos y el que presentaba las semillas en el momento de la siembra.

Tabla I. Crecimiento y concentración de nitrógeno por órganos en la canavalia y el maíz crecidos en condiciones experimentales

Cultivo	Masa seca (t.ha ⁻¹)			N (%)		
	Hojas	Tallos	Total	Hojas	Tallos	Semillas
Canavalia	3.61	4.91	8.52	2.05 a	1.15 a	4.9 a
Maíz	4.48	7.92	12.40	0.53 b	0.31 b	1.92 b
ES _χ	1.002 NS	1.20 NS	2.08 NS	0.12**	0.05**	0.08**

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según Prueba de Tukey para un nivel de confianza del 95 %

A pesar del bajo contenido inicial de N en el suelo, se puede considerar que el crecimiento en ambas especies fue bueno, observándose diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de N, lo cual es lógico si se tiene en consideración que se está comparando a una leguminosa capaz de fijar N atmosférico y una gramínea que solo tiene como fuente principal del elemento, el disponible en el suelo, pues aún no se ha demostrado que el maíz sea capaz de fijar N, aunque otras especies gramíneas, como la caña de azúcar, sí lo son.

En Colombia, se ha demostrado que la canavalia es capaz de aportar 9748 kg.ha⁻¹ de biomasa seca y el maíz 10068 kg.ha⁻¹. Por otra parte, la concentración de N en la leguminosa alcanza el 2.19 % en esas condiciones (11).

Estos resultados están en correspondencia con los informados para especies promisorias de abonos verdes en Cuba, las cuales deben aportar más de 2 t.ha⁻¹ de masa seca y más de 100 kg N.ha⁻¹ (3).

En otras regiones del mundo, como en África Central, se ha informado que canavalia es una de las especies más eficientes para lograr una rápida cobertura del suelo, siendo capaz de aportar más de 4 t de masa seca.ha⁻¹, incluso en regiones de baja fertilidad y/o zonas áridas (12).

En la Tabla II se observa el contenido de N presente en los tallos y hojas del maíz y la canavalia, así como la fijación biológica del N, realizada por la canavalia.

Se puede apreciar que el contenido de N es más alto en la canavalia, lo cual está en correspondencia con las concentraciones en cada órgano encontradas en las plantas (Tabla I). Es necesario destacar que este contenido de N, sobre todo en canavalia, está en correspon-

dencia con el crecimiento y desarrollo de esta especie en las condiciones de primavera-verano en Cuba (3).

Tabla II. Contenido de nitrógeno por órgano y total de la canavalia y el maíz, y cuantificación de la fijación biológica del nitrógeno

Cultivo	Contenido de N			FBN	
	Hojas (g.planta ⁻¹)	Tallos (g.planta ⁻¹)	Total	Semilla (mg.semilla ⁻¹)	(kg.ha ⁻¹) (%)
Canavalia	73.71	56.43 a	130.13 a	62.23	81.77 62.84
Maíz	23.22	25.08 b	48.30 b	5.57	- -
ES _χ	18.88 NS	8.84**	26.61**		

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según Prueba de Tukey para un nivel de confianza del 95 %

Por otra parte, se observa que la FBN es del orden del 62.84 %, equivalente a 81.77 kg N.ha⁻¹.

En estudios realizados en Cuba, por el método de dilución isotópica, se ha determinado que la canavalia fija entre 25-39 %, lo que equivale a 40-50 kg N.ha⁻¹, utilizando al sorgo y al maíz como plantas de referencia (13).

En Brasil, se ha cuantificado que canavalia fija 71 % N (43 kg N.ha⁻¹) utilizando al sorgo como planta control y 90 % (55 kg N.ha⁻¹) utilizando al maíz como control (14). A su vez, en México se ha determinado que *Canavalia ensiformis* es capaz de fijar hasta 318 kg N.ha⁻¹ en todo su ciclo de vida, si está colonizada por especies nativas de *Rhizobium* que sean capaces de hacer una fijación del N efectiva (15).

Es necesario tener en cuenta que los valores de la FBN cambian al utilizar diferentes plantas de referencia que varían su capacidad de absorción de nutrientes. A medida que la planta de referencia sea capaz de absorber una mayor cantidad de N, disminuye el valor de la estimación de la FBN (13).

También se plantea que en suelos con bajo contenido de N disponible, la proporción del N presente en las leguminosas derivado del aire es generalmente alto. En este caso, el cultivo precedente a la siembra de canavalia y maíz fue la vegetación natural, con alta relación C:N y se plantea que si el cultivo precedente a la leguminosa tiene una alta relación C:N, entonces ocurre una tendencia a inmovilizar el N disponible del suelo y, con eso, el sistema fijador de N₂ se establece más rápidamente, garantizando mayores contribuciones de la FBN para el cultivo (16).

Otro factor a considerar es la alta densidad que se utiliza cuando se siembran abonos verdes, lo que trae por consecuencia un mayor consumo inicial del N del suelo, provocado por una mayor densidad de plantas en el campo, lo que proporcionará un mayor estímulo para la FBN si es comparado con áreas de menor densidad de siembra (16).

De manera general, se puede considerar que el estimado de fijación FBN que realiza la canavalia es suficiente, para garantizar un óptimo desarrollo en las condiciones estudiadas y facilitar su empleo como abono verde en suelos con bajos contenidos de nitrógeno.

REFERENCIAS

1. Peña, J. J. Introducción. En: La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Acuerdo Regional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL). Irapuato:IMPROSA de CV, 2000, p. 1.
2. Martín, G. M. y Rivera R. Mineralización del nitrógeno incorporado con los abonos verdes y su participación en la nutrición de cultivos de importancia económica. Revisión Bibliográfica. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 3, p. 89-96.
3. García, M.; Treto, E. y Álvarez, M. Época de siembra más adecuada para especies promisorias de abonos verdes en las condiciones de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 5-14.
4. Vera, J. A.; Grageda, O. A. y Peña, J. J. Metodologías para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. En: La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Acuerdo Regional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL). Irapuato:IMPROSA de CV, 2000, p. 59-67.
5. Resende, A. S. de; Alves, B. J. R.; Boddey, R. M. y Urquiaga, S. Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio. Seropédica: EMBRAPA Agrobiología, Documentos, 2003, 165, 26 p.
6. Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Alves, B. J. R. y Reis, V. Endophytic nitrogen fixation in sugar cane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 2003, vol. 252, p. 139-149.
7. Cuba. Minagri. Instituto de Suelos. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana: Agrinfor, 1999. 64 p.
8. WRB. World Reference Base for Soil Resources. Classification Key. FAO AGL. Consultado [17-1-2007]. Disponible en: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/wrb/newkey.stm>>.
9. Yagodin, B. A. Agroquímica. Moscú: Editorial Mir, 1986. t 1.
10. Fernández, M. F.; Fernández, R. P. M. y Hungria, M. Seleção de rizobios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Pesq. Agropec. Bras.*, 2003, vol. 38, no. 7, p. 835-842.
11. Salamanca, W. F.; Bonilla, C. R. y Sánchez, M. S. Evaluación de seis abonos verdes en un vertisol ústico en condiciones del Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 2004, vol. 53, no. 3-4 on line. Disponible en: <http://www.biblioteca.palmira.unal.edu.co/acta_agronomica_vol53_No_3-4/evaluacion.htm>.
12. Carsky, J. R. y Ndikawa, R. Identification of cover crops for the semi-arid savanna zone of West Africa. IRDC Free Books on line. Consultado [17-1-2007]. Disponible en: <http://www.idrc.ca/en/ev-31928-201-1-DO_TOPIC.html>.
13. Álvarez, M. Los abonos verdes: una alternativa para la producción sostenible de maíz en las condiciones de los suelos Ferralíticos Rojos de La Habana. [Tesis de Maestría]; INCA, 2000. 19 p.
14. Resende, A. S. de; Xavier, R. P.; Quesada, D. M.; Urquiaga, S.; Alves, B. J. R. y Boddey, R. M. Use of green manures in increasing inputs of biologically fixed nitrogen to sugar cane. *Biol. Fertil. Soils*, 2003, vol. 37, p. 215-220.
15. AIEA. 2004. Co-ordinated research project on "Development of Management Practices for Sustainable Crop Production Systems on Tropical Acid Soils through the Use of Nuclear and Related Techniques" CRP D1.50.06. Final Report. IAEA-311-D1-RC.810.4. Viena. Disponible en: <<http://www-naweb.iaea.org/nafa/swmn/crp/4rcm-acid-soils-vienna04.pdf>>.
16. Macedo, R. A. T.; Zotarelli, L.; Urquiaga, S.; Boddey, R. M. y Alves, B. J. R. Efeito do manejo sobre a FBN na cultura da soja avaliada através da técnica de ureidos. Seropédica: EMBRAPA Agrobiología. *Boletín de Pesquisa y Desenvolvimento*, 2003, vol. 31, p. 26.

Recibido: 22 de febrero de 2007

Aceptado: 22 de octubre de 2007