

Evaluación de algunos parámetros relacionados con la fijación de N₂ en *Gliricidia sepium* Jacq.

Evaluation of some traits related to N-fixation in *Gliricidia sepium* Jacq.

González, Ana¹; González, Marcial¹; Leal, Angel² y Michelena, Vicente³

¹ Laboratorio de Plantas y Semillas Forrajeras. Escuela de Ingeniería de Producción Animal. Universidad de Oriente. Monagas. ² Laboratorio de Biofertilizantes, Instituto Universitario de Tecnología José Antonio Anzoátegui, El Tigre. E-mail: chivo01@telcel.net.ve y ³ Laboratorio de Ecofisiología Vegetal. Universidad de Oriente. Monagas. E-mail: vicmiche@telcel.net.ve

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la efectividad y la eficiencia de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. – *Gliricidia sepium* se estableció un ensayo de invernadero. El diseño experimental fue bloques divididos, con tres repeticiones y cuarenta combinaciones de tratamientos constituidos por las cepas TAL-4, TAL-5, TAL-6, TAL-7 y TAL-1770; plántulas sin inocular; plántulas sin inocular más 80 kg de N.ha⁻¹; plántulas en suelo estéril más 80 kg de N.ha⁻¹; y las accesiones de *G. sepium* San Vicente, Tunapuy, Caripito, Copey y Canchunchú. A los cuatro meses después de la siembra se realizó la cosecha y se determinó la concentración de clorofila ($\bar{a} + \bar{b}$), el peso seco de los nódulos, el peso seco total de la planta, el porcentaje de nitrógeno foliar, radical y nodular y el contenido total de nitrógeno en la planta. TAL-4 produjo la mayor concentración de clorofila ($\bar{a} + \bar{b}$) (9,03 mg/l/planta) en tanto que el tratamiento con cepas nativas más 80 kg de N.ha⁻¹ indujo el mayor peso seco de nódulos (134,77 mg), peso seco total (11,67 g) y contenido de nitrógeno total (22,90 mg/planta). La accesión Canchunchú presentó la mayor concentración de clorofila ($\bar{a} + \bar{b}$) cuando se le comparó con el resto de las accesiones. El porcentaje de nitrógeno tanto en la parte aérea, como en la raíz y en los nódulos fue igual entre tratamientos y accesiones. No se determinó efecto significativo entre las accesiones ni para la interacción *Bradyrhizobium* sp.-*Gliricidia* sp. en ninguna de las variables estudiadas.

Palabras claves: FBN, *Gliricidia*, *Bradyrhizobium*, clorofila, peso seco

ABSTRACT

A greenhouse experiment was carried out in order to evaluate effectiveness and efficiency of *Bradyrhizobium* sp. – *Gliricidia sepium* symbiosis. The experimental design was a split block, with three replicas and forty combinations of treatments: five *Bradyrhizobium* strains TAL-4, TAL-5, TAL-6, TAL-7 and TAL-1770; non inoculated seedlings; non inoculated seedlings fertilized with 80 kg N.ha⁻¹; seedlings grown in sterile soil and fertilized with 80 kg N.ha⁻¹; and *G. sepium* cultivars: San Vicente, Tunapuy, Caripito, Copey and Canchunchu. After four months plants were harvested. Chlorophyll ($\bar{a} + \bar{b}$) concentration, nodules and plant dry weights; N in leaves, roots, nodules and total N were determined. TAL-4 yielded the highest chlorophyll ($\bar{a} + \bar{b}$) (9.03 mg/l/plant). Non inoculated plants fertilized with 80 kg N.ha⁻¹ produced the highest dry weight of nodules (134.77 mg), total dry weight (11.67 g) and total N (22.90 mg/plant). The percentages of N in leaves, roots and nodules were not statistically different. There was significant difference in the interaction *Bradyrhizobium* – *Gliricidia* in any of the evaluated variables.

Key words: BNF, *Gliricidia*, *Bradyrhizobium*, chlorophyll, dry weight

INTRODUCCIÓN

Gliricidia sepium Jacq. es un arbusto leguminoso con un extraordinario potencial como productor de significativa cantidad de follaje rico en proteínas para el consumo animal, principalmente en la época de mayor déficit forrajero, como son los meses más secos del año (febrero a mayo). Originario de México y Centroamérica, se conoce comúnmente con los nombres de “mata ratón”; “rabo de ratón”, “capa ratón” y tiene amplia distribución en toda la zona tropical (González, 1996). El alto potencial de

producción de biomasa comestible y elevado valor nutritivo presenta a *Gliricidia* como una alternativa práctica y económica para incrementar la productividad animal y contribuir, de esta manera, a disminuir los costos de producción (Clavero, 1996). La propiedad de estos árboles de fijar nitrógeno simbióticamente reviste una gran importancia, tanto desde el punto de vista alimenticio como ecológico, porque la integración de *Gliricidia* en sistemas estables agroforestales y sistemas semi-árido-silvo-pastoriles permiten la restauración y mantenimiento de la fertilidad del suelo, en adición al combate de la

erosión y la desertización (Febles, *et al.* 1996). Se han obtenido excelentes resultados en suelos ácidos del Oriente Venezolano cuando *Gliricidia* se utiliza como banco de proteínas en sistemas forrajeros acompañada de gramíneas introducidas, o como cerca viva haciendo innecesario el uso de alambre de púas. La producción de leche, así como la calidad de la misma, en suelos ácidos de sabana ha sido sensible y positivamente incrementada en sistemas asociados de *Gliricidia* con gramíneas en pastoreo directo (González, 2000). Sin embargo, a pesar de las bondades de éste árbol leguminoso, en Venezuela se ha estudiado muy poco el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno por los rizobios y *G. sepium*. La mayoría de la información que se tiene al respecto proviene de Australia, África y Centro América.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el ensayo de invernadero, se utilizó suelo de un Ultisol no cultivado de pH 5,1 (Potenciométrico 1:1), de escasa materia orgánica 1,20 % (Walkey-Black) y de baja capacidad de intercambio catiónico efectiva de 1,46 cmol.kg⁻¹ (Σ de cationes más acidez intercambiable) y de textura areno-francosa (Bouyoucos). El suelo se dispuso en porrones de arcilla de 4 kg de capacidad, y se esterilizó mediante calor, excepto el destinado a los tratamientos con cepas nativas. Las semillas de *G. sepium*, accesiones: San Vicente, Caripito, Copey, Tunapuy y Canchunchú (donadas por el Lab. de Plantas y Semillas Forrajeras de la Escuela de Ingeniería de Producción Animal de la Universidad de Oriente) se desinfectaron con mercurio acidificado, se lavaron con abundante agua esterilizada y se sembraron en vermiculita previamente esterilizada en autoclave. Las cepas de *Bradyrhizobium* de la colección NifTAL (University of Hawaii, NifTAL-Mircen Project): TAL-4, TAL-5, TAL-6, TAL-7 y TAL-1770 fueron crecidas en un medio líquido de levadura-manitol (Vincent, 1970), a temperatura ambiente por siete días con agitación constante (100 rpm.). La concentración de rizobios (cel/ml) se determinó mediante la cámara de Petroff-Hausser. La inoculación se hizo por inmersión de las plántulas en la suspensión bacteriana. Se aplicaron los fertilizantes como soluciones nutritivas al momento de la siembra. Como fuente de calcio y fósforo se utilizó fosfato de calcio (Ca(H₂PO₄)₂H₂O) en dosis de 60 kg de P₂O₅. ha⁻¹ y como fuente de potasio se usó KCl (30 kg de K₂O.ha⁻¹). El riego se realizó *ad libitum*, con agua destilada, hasta el momento de la cosecha, a los cuatro meses después de la siembra. La clorofila

($\bar{a} + \bar{b}$) se extrajo de discos (10 mg) de las hojas medias, en metanol al 95 % (v/v), durante doce horas, y se aplicó la ecuación: clorofila ($\bar{a} + \bar{b}$) = 25,5A₆₅₀ + 4,0A₆₆₅ de Sestack, Catsky y Jarvis para el metanol (Wintermans y De Mots, 1965). La raíz se extrajo del porrón mediante presión de agua y se separaron los nódulos de la raíz y ésta del tallo. Las muestras se secaron en la estufa a 80 ° C hasta peso constante y se molieron en un molino de 60 mallas/pulg. Los valores de nitrógeno de la parte aérea, de la raíz y de los nódulos se determinaron por micro-Kjeldahl. El diseño estadístico utilizado fue bloques divididos o diseño con ambos factores en franja (Steel y Torrie, 1992). Los tratamientos fueron: a) plántulas sin inocular y sin aplicación de nitrógeno (Cn); b) plántulas sin inocular más 80 kg de N.ha⁻¹ (Cn+N) (úrea aplicada al momento de la siembra); c) plántulas sin rizobio (suelo esterilizado) más 80 kg de N.ha⁻¹ (Co+N) y d) plántulas inoculadas con las cepas TAL-4, TAL-5, TAL-6, TAL-7 y TAL-1770. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante la prueba de significación de Duncan al 0,05 de probabilidad. Las variables medidas fueron: concentración de clorofila ($\bar{a} + \bar{b}$), peso seco de nódulos, peso seco total de la planta, porcentaje de N del follaje, de la raíz y de los nódulos y contenido total de N en la planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de clorofila ($\bar{a} + \bar{b}$)

El análisis de varianza determinó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas y entre las accesiones. En el cuadro 1 se observa que la cepa TAL-4 indujo la mayor concentración de clorofila para las cinco accesiones con 9,03 mg de clorofila/l/planta seguida por las cepas TAL-5 y TAL-6, con medias de 8,51 y 8,36 mg respectivamente, superando a los tratamientos con aplicación de nitrógeno (Co+N y Cn+N), con valores promedios de 7,86 y 7,71 mg respectivamente. El tratamiento sin aplicación de nitrógeno (Cn) presentó un valor promedio de 7,23 mg, significativamente diferente al encontrado con las cepas TAL-1770 con 6,58 y TAL-7 con 6,48 mg de clorofila/l/planta.

En el cuadro 2 se observa que la accesión Canchunchú presentó la mayor concentración de clorofila con 8,71 mg/l/planta. Las demás accesiones se comportaron estadísticamente iguales, con valores que oscilaron entre 7,63 y 7,12 mg/l/planta.

Cuadro 1. Concentración de clorofila (mg/l/planta), peso seco de nódulos (mg), peso seco total (g) y contenido total de nitrógeno (mg/planta) de *Gliricidia sepium* sin inocular o inoculada con diferentes cepas de *Bradyrhizobium sp.*

Tratamiento	Concentración de Clorofila (mg/l)	Peso seco de Nódulos (mg)	Peso seco total (g)	Contenido total de N (mg/planta)
Cn+N	7,71 c *	134,77 a	11,67 a	22,90 a
Cn	7,23 d	110,04 a	8,64 b	17,85 b
Co+N	7,86 c	16,97 b	6,74 c	14,39 b
TAL-7	6,48 e	13,63 b	6,71 c	13,21 bc
TAL-6	8,36 b	13,27 b	5,96 cd	11,97 bc
TAL-4	9,03 a	12,54 b	5,88 cd	10,80 bc
TAL-5	8,51 b	9,95 b	4,44 d	8,75 c
TAL-1770	6,58 e	9,29 b	4,00 d	8,84 c

* Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales

Peso seco de nódulos

Hubo significación estadística solo para las cepas. Los tratamientos Cn+N y Cn se comportaron estadísticamente iguales, con valores promedios de 134,77 y 110,04 mg, respectivamente. No se observó un efecto deletéreo en el peso seco de nódulos por efecto del N edáfico. Las cepas introducidas rindieron iguales que el tratamiento Co+N, con valores que oscilaron entre 16,97 y 9,29 mg (Cuadro 1). El peso seco de nódulos de las cepas nativas fue, aproximadamente, diez veces mayor que el presentado por las cepas introducidas. La no esterilización del suelo pudo haber sido la causa de éste comportamiento. Las cepas nativas fueron más infectivas que las introducidas y en consecuencia hubo mayor masa nodular en las primeras. Aunque el número de nódulos no se describe en este estudio, es

importante señalar que la cepa nativa fue la que produjo el mayor número de nódulos, quizás sea la causa de los resultados observados en el peso seco nodular.

Peso seco total

Las plantas del tratamiento Cn+N dieron mayor peso seco total con un valor promedio de 11,67 g, seguida por las del tratamiento Cn con un promedio de 8,64 g (Cuadro 1). El peso seco de las plantas del tratamiento Co+N (6,74 g) fue estadísticamente igual al peso seco de las plantas de los tratamientos TAL-7 (6,71 g), TAL-6 (5,96 g) y TAL-4 (5,88 g). La no diferencia en peso seco total entre las cepas indica que en presencia de la cepa nativa, las plantas producen más biomasa que en ausencia de esta, aún con la adición de 80 kg.ha⁻¹, lo cual debió, teóricamente, haber ejercido un efecto deletéreo en los *rizobia* nativos. Los tratamientos Cn+N y Cn fueron más eficientes que las cepas introducidas en la producción de materia seca.

Porcentaje de nitrógeno

Los análisis de varianza de los valores porcentuales de nitrógeno en el follaje, en la raíz y en los nódulos determinaron efectos no significativos en los tratamientos estudiados.

Contenido total de nitrógeno

En el Cuadro 1 se observa que el tratamiento Cn+N indujo el mayor contenido de nitrógeno por planta con 22,90 mg, seguido por los tratamientos Cn y Co+N con 17,85 y 14,39 mg, respectivamente. Las cepas TAL-7, TAL-6 y TAL-4 presentaron igual

Cuadro 2. Concentración de clorofila (mg/l/planta) en accesiones de *G. sepium* sin inocular o inoculadas con diferentes cepas de *Bradyrhizobium sp.*

Accesiones	Concentración de clorofila (mg/l/planta)
Canchunchú	8,71 a *
Tunapuy	7,63 b
Copey	7,59 b
Caripito	7,54 b
San Vicente	7,12 b

* Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales.

comportamiento estadístico con valores promedios respectivos de 13,21; 11,97 y 10,80 mg de N/planta. El menor contenido de nitrógeno lo presentaron las cepas TAL-1770 y TAL-5 con valores de 8,84 y 8,75 mg de N/planta respectivamente. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Sanginga *et al.* (1995), quienes midieron la variación de la nodulación y fijación de N₂ por la simbiosis *G. sepium-Bradyrhizobium sp.* en un suelo calcáreo, encontrando diferencias significativas en la cantidad de nitrógeno fijado entre las 25 accesiones usadas en el experimento; cosechadas a los 14, 35 y 53 semanas después de la siembra. Sin embargo, los resultados obtenidos tienen similitud con los encontrados por Awonaike *et al.* (1992), quienes estudiaron la influencia del genotipo de la planta, cepa bacteriana y su interacción sobre la fijación biológica del nitrógeno de la simbiosis *G. sepium-Bradyrhizobium sp.* Ellos concluyeron que ninguna cepa fue superior sobre todas las accesiones hospederas y ninguna accesión fue superior en fijación de nitrógeno a las cinco cepas bacteriales incluidas en este estudio. En ambos casos se demostró que la fijación de N₂ y el rendimiento general de *G. sepium* estuvo influenciado por la cepa de *Bradyrhizobium* inoculado.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Todos los parámetros, con excepción de la concentración de clorofila, medidos a las plantas en suelo sin esterilizar (Cn+N y Cn) fueron considerablemente mayores a los tratamientos en suelo esterilizado. Las plantas de *G. sepium* crecidas en presencia de cepas nativas más 80 kg de N.ha⁻¹ (Cn+N) presentaron mayor peso seco total, así como más nitrógeno total en relación a aquellas que crecieron sólo en presencia de la cepa nativa (Cn). Cuando se esterilizó el suelo, todos los tratamientos reportaron igual peso nodular. El porcentaje de nitrógeno de la raíz, de los nódulos y de la parte aérea fue igual en todos los tratamientos y en las cinco accesiones probadas en el ensayo. Con excepción de la concentración de clorofila, las cepas introducidas TAL-4, TAL-5, TAL-6, TAL-7 y TAL-1770 tuvieron igual comportamiento en todos los parámetros del ensayo. La cepa TAL-4 y la accesión Canchunchú, individualmente, indujeron la mayor concentración de clorofila. No hubo efecto de interacción en la simbiosis *G. sepium-Bradyrhizobium sp.* Se recomienda realizar experiencias similares sin esterilizar el suelo y en condiciones de campo.

LITERATURA CITADA

- Awonaike, K.; G. Hardarson and K. S. Kumarsingh. 1992. Biological nitrogen fixation of *G. sepium-Rhizobium* symbiosis as influenced by plant genotype, bacterial strain and their interactions. *Tropical Agriculture* 69: 381-385.
- Clavero, T. 1996. Las Leguminosas Forrajeras Arbóreas: Sus perspectivas para el trópico americano. En: Leguminosas Forrajeras Arbóreas en la Agricultura Tropical. Clavero, T. ed. Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. LUZ. Maracaibo, Venezuela. p. 1-10.
- Febles, G.; T. E. Ruiz, y L. Simón. 1996. Consideraciones Acerca de la Integración de los Sistemas Silvopastoriles a la Ganadería Tropical y Subtropical. En: Leguminosas Forrajeras Arbóreas en la Agricultura Tropical. Clavero, T. ed. Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. LUZ. Maracaibo. Venezuela. p. 91- 99.
- González, M. 1996. Leguminosas Forrajeras en Sistemas de Producción Animal del Nororiente de Venezuela. En: Leguminosas Forrajeras Arbóreas en la Agricultura Tropical. Clavero, T. ed. Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. LUZ. Maracaibo. Venezuela. p.115- 134.
- González, M. 2000. Leguminosas Arbustivas y Arbóreas como Alternativa Económica para la Alimentación Animal. En: Encuentro con Productores de los Diferentes Municipios del Estado Monagas. Mimeografiado. 9 p.
- Sanginga, N; B. Vanlauwa, and A. Danso. 1995. Management of biological N₂ fixation in alley cropping systems. *Soil* 174: 119-141.
- Steel, H. y L. Torrie. 1992. Bioestadística. Principios y procedimientos. Segunda Edición. McGraw Hill Hispanoamericana. México. 381 p.
- Vincent, J. M. 1970. Manual for the practical study of root bacteria. I. B. P. Handbook Nro 15. Blackwell. Oxford, U. K. 164 p.
- Wintermans, J. and A. De Mots. 1965. Spectrophotometric of chlorophyll a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys. Acta* 109: 448-453.