

LA ACIDEZ DEL SUELO Y SU EFECTO SOBRE LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS¹

Soil acidity and its effects on symbiotic nitrogen fixation on pasture legumes

Leticia Barrientos D.², Ricardo Campillo R.³ y Edith Méndez A.²

S U M M A R Y

During the 1993 season, a field research trial was carried out in a transitional soil, characterized by high acidity, in the IX Region. The purpose was studying the effects of calcium carbonate over the establishment of lucerne, berseem, crimson, red and white clover and alfalfa and their impact on the symbiotic nitrogen fixation.

In absence of lime, the production of dry matter was drastically reduced and a low account and weight of nodules formed on the roots were obtained. Moreover, a low activity of the nitrogenase enzyme in the plants nodules was registered. Nitrogenase activity was evaluated through acetylene reduction assay.

However, in presence of lime (4 ton/ha), there was an important and significant increase of the parameters referred above, since the toxic aluminium of the soil was neutralized by the carbonate applied through this management practice.

Key words: pasture legumes, soil, acidity, nitrogen fixation.

INTRODUCCION

Los suelos ácidos y la acidificación de los suelos son problemas de gran relevancia y en aumento en la agricultura mundial de altos rendimientos (Cooper y otros, 1983; Fageria y otros, 1985). Los suelos ácidos limitan tanto el tipo de cultivo que puede desarrollarse, como su productividad. Algunos cultivos de importancia afectados son las praderas y las leguminosas de grano, los cuales, por su asociación con bacterias radicales fijadoras de nitrógeno hacen una contribución importante al balance de nitrógeno de los sistemas agrícolas (Flis y otros, 1993).

La acidificación es un proceso natural que ocurre muy lentamente en los suelos con alta pluviometría como consecuencia de la lenta, pero constante, pérdida de bases. Sin embargo, ha sido el hombre quien mayor influencia ha tenido en acelerar este proceso, al practicar una agricultura intensiva y muy extractiva, que no ha ido aparejada con una adecuada reposición de nutrientes y bases al suelo. Por

otra parte, la utilización indiscriminada de fertilizantes de reacción ácida, especialmente los amoniacales, sin considerar sus limitaciones de uso y la necesidad de neutralizar sus efectos acidificantes y las características de los suelos, ha derivado en una paulatina acidificación de los suelos sometidos a este manejo (Sadzawka y Campillo, 1993).

La acidez del suelo es un problema complejo, debido, en parte, a elevadas concentraciones de iones H⁺, especialmente cuando el pH es inferior a 5, a toxicidad de aluminio y manganeso, y disponibilidad limitada de calcio, molibdeno y fósforo (Flis, y otros, 1993). Sin embargo, el principal factor limitante de la productividad de los cultivos en suelos ácidos es la movilización del aluminio en la solución de suelo, por descenso del pH, el que puede alcanzar niveles tóxicos para las plantas y organismos del suelo (Wright, 1989).

Las leguminosas, cuyo crecimiento depende fundamentalmente del suministro de nitrógeno proveniente de la fijación simbiótica, son, aparentemente, más susceptibles a la toxicidad de aluminio que las leguminosas que reciben nitrógeno inorgánico (Wright, 1989; Vance, 1991). La toxicidad de aluminio puede tener un efecto perjudicial sobre la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, ya sea dañando directamente a la planta hospedera, reduciendo la sobrevivencia del rizobio, o interfiriendo con alguno

¹Recepción de originales: 1 de febrero de 1994.

Trabajo presentado en el 44º Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile, Valdivia, 17 al 19 de noviembre de 1993.

²Estación Experimental Carillanca (INIA), Casilla 58-D, Temuco, Chile.

³Estación Experimental Remehue (INIA), Casilla 24-O, Osorno, Chile.

de los estados de la nodulación y funcionamiento del proceso simbiótico (Holding y Lowe, 1971).

Con el objetivo de estudiar el efecto de la acidez del suelo y su corrección con carbonato de calcio, junto con el impacto sobre la fijación simbiótica de nitrógeno, se condujo un experimento de campo con las especies trébol alejandrino (*Trifolium alexandrinum* L.), trébol encarnado (*T. incarnatum* L.), trébol rosado (*T. pratense* L.), trébol blanco (*T. repens* L.) y alfalfa (*Medicago sativa*).

MATERIALES Y METODOS

El sitio experimental se ubicó en un suelo transicional, cercano a Pailahueque, en el valle central de la comuna de Ercilla, IX Región. Los tratamientos de CaCO_3 como cal IANSA (83% CaCO_3), fueron incorporados al suelo 25 días previo al establecimiento, para permitir que se expresara el efecto de la cal (tiempo de incubación). Los tratamientos corresponden a un arreglo factorial de las especies leguminosas y cuatro niveles de CaCO_3 , en un diseño de parcelas divididas, con cuatro repeticiones. Para los objetivos de esta evaluación se muestreó suelo solamente en las parcelas del experimento con los niveles de 0 y 4 ton/ha de cal. En esta oportunidad se tomaron muestras de suelo con barreno (0-7,5 cm), por bloque, para su caracterización. Al momento de la siembra, se muestreó suelo por parcela para determinar la influencia del encalado, es decir, determinar si se había manifestado o no el efecto de la cal. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas, de la Estación Experimental Carillanca, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias, para los análisis químicos correspondientes.

La siembra del experimento se realizó en abril de 1993 con las especies forrajeras trébol alejandrino, trébol encarnado, trébol rosado, trébol blanco y alfalfa, cuyas semillas se inocularon con un producto comercial específico, obtenido en PROBICAL, y se recubrieron con carbonato de calcio (30% por kilo de semilla).

La fertilización base incluyó 50 kg/ha de fósforo como superfosfato triple y 200 kg/ha de potasio como KCl. Posteriormente, se aplicaron 58 kg/ha de K, 70 kg/ha de S y 50 kg/ha de Mg como Sulpomag.

A los 90, 120 y 150 días después de la emergencia de las especies leguminosas, se tomaron, al azar, diez plantas por parcela y a cada una de ellas se les determinó el número, peso de nódulos y materia seca producida por la parte aérea (Vincent, 1982).

En terreno, se determinó la actividad de la enzima nitrogenasa, mediante la técnica reducción de acetileno, incubando las plantas con su sistema radical intacto en jarros herméticos, durante 1 hora en un ambiente con 10% (v/v) de acetileno, metodología propuesta por Hardy y otros (1973). El acetileno y etileno se determinaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8600, equipado con un detector de ionización de llama y columna empacada Porapak N.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis químico inicial de este suelo (Cuadro 1) muestra un pH fuertemente ácido, con muy bajo contenido de calcio, magnesio y suma de bases. Paralelamente, se observan niveles muy altos de aluminio de intercambio y de saturación de aluminio, lo que contrasta con el alto contenido de fósforo disponible del suelo (28 mg/kg). Todos los parámetros de acidez confirman el grado de deterioro que presenta este suelo, derivado de un uso excesivo de fertilizantes amoniacales aplicados por un período de ocho a diez años a los cultivos de la rotación.

CUADRO 1. Características químicas del suelo Pailahueque

TABLE 1. Chemical characteristics of Pailahueque soil

Análisis	Tratamientos	
	0	4
	CaCO ₃ , ton/ha	
Fósforo Olsen, mg/kg	28,0	28,0
pH en agua (1:2,5)	5,3	6,0
pH CaCl ₂ (1:2,5)	4,6	5,4
Calcio intercambiable, cmol(+)/kg	2,1	10,6
Magnesio intercambiable, cmol(+)/kg	0,5	0,9
Suma de bases, cmol(+)/kg	3,4	12,3
Aluminio intercambiable, cmol(+)/kg	1,3	0,0
Saturación de aluminio, %	27,0	0,0

Con la aplicación de 4 ton/ha de CaCO_3 se advierte un cambio radical de los factores químicos que están causando problemas de acidez (Cuadro 1). Es así como el pH, calcio y magnesio de intercambio y la suma de bases se incrementan a valores normales, mientras que los niveles de aluminio de intercambio y saturación de aluminio desaparecen. Es decir, la aplicación de 4 ton/ha de CaCO_3 permitió normalizar completamente los parámetros que caracterizan la acidez química del suelo.

El efecto detrimental de las condiciones ácidas del suelo se manifiesta claramente en la etapa de establecimiento de estas leguminosas. Cuando no se aplicó cal, se restringió drásticamente la producción de materia seca (Figura 1). Esto se debería a los daños que causa la toxicidad de aluminio en el sistema radical, lo que también provoca el retraso en el desarrollo de la planta. Al respecto, Wright (1989), señala que el crecimiento de las raíces se restringe severamente por el daño que causa el exceso del aluminio. Los ápices radicales y las raíces laterales se adelgazan, y las ramificaciones finas y pelos radicales se reducen. A consecuencia de esto, las raíces dañadas por Al pueden explorar un volumen limitado de suelo, y presentan serias limitaciones para absorber nutrientes y agua. El exceso de Al en el suelo interfiere con la captación, transporte y utilización de nutrientes esenciales, tales como Ca, Mg, K, P y Fe. A nivel celular, la toxicidad de Al afecta la estructura y funcionamiento de la membrana, la síntesis de DNA y la mitosis, la elongación celular y la nutrición mineral y el metabolismo (Fageria y otros, 1988).

En el caso específico de las leguminosas forrajeras, el daño más importante ocurre en el mecanismo de la fijación de nitrógeno. Las limitaciones provocadas por la toxicidad de Al puede afectar cualquier etapa de la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, como por ejemplo, la sobrevivencia del *Rhizobium* en el suelo, su multiplicación en la rizósfera, la infección de las raíces, la formación y funcionamiento de los nódulos y el crecimiento de la planta huésped (Cooper y otros, 1983). Esto se refleja claramente en este ensayo por la fuerte disminución del número (Figura 2) y peso de nódulos (Figura 3) formados en las raíces de las plantas que crecen sin encalado y, en la baja actividad de la enzima nitrogenasa (Figura 4), responsable de la fijación de nitrógeno. Los datos correspondientes a la evaluación efectuada a los 150 días, presentan similar tendencia que aquellos medidos a los 120 días (datos no presentados).

Munns (1968) y Lie (1969), trabajando con alfalfa y arvejas en condiciones controladas, sugirieron una etapa "ácido sensible" en el proceso de infección, la que ocurriría en las primeras 12 horas después de la inoculación, a bajo pH (menor a pH 5,5). Esta etapa coincidiría con el curvamiento de los pelos radicales. Esta temprana etapa del proceso de infección, que es inhibida por bajo pH, es considerada como más adversa si la concentración de Ca es baja (Munns, 1970). Alva y otros (1986), demostraron que el aumento de la concentración de Ca presenta un efecto benéfico para el crecimiento de las raíces bajo estrés de Al, y esta respuesta era variable dependiendo de la especie vegetal.

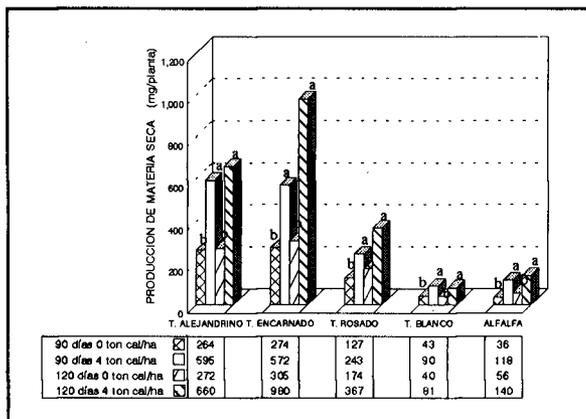


FIGURA 1. Producción de materia seca de las leguminosas con y sin encalado del suelo. Cifras con distinta letra en sentido vertical indican diferencias significativas, de acuerdo a la Prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

FIGURE 1. Dry matter production of legumes with and without lime. Figures with different vertical letter show significant differences according to Duncan Test ($P \leq 0.05$).

La toxicidad de Al en leguminosas en simbiosis, ha recibido poca atención, a pesar del hecho que, bajo estas condiciones, la respuesta de la planta puede ser diferente a la respuesta en la presencia de nitrógeno combinado. En experimentos con *Stylosanthes* nodulado y no nodulado, creciendo con nitrógeno combinado, Carvalho y otros (1981), concluyeron que las plantas noduladas eran más sensibles al aluminio que las plantas que recibían nitrógeno mineral.

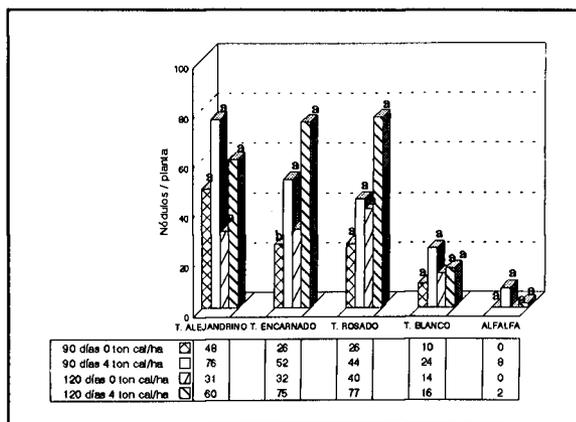


FIGURA 2. Número de nódulos radicales de las leguminosas con y sin encalado del suelo. Cifras con distinta letra en sentido vertical indican diferencias significativas, de acuerdo a la Prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

FIGURE 2. Nodule numbers in roots of legumes with and without lime. Figures with different vertical letter show significant differences according to Duncan Test ($P \leq 0.05$).

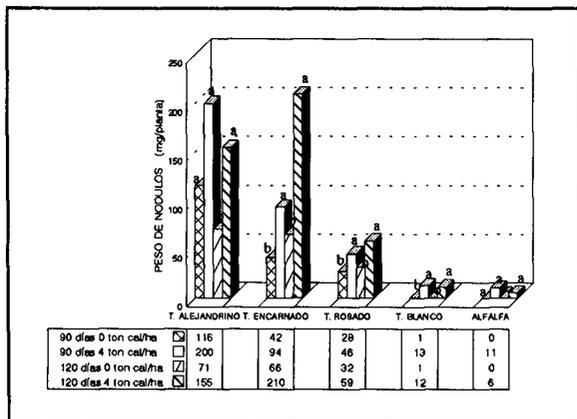


FIGURA 3. Peso de nódulos radicales de las leguminosas con y sin encalado del suelo. Cifras con distinta letra en sentido vertical indican diferencias significativas, de acuerdo a la Prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

FIGURE 3. Root nodule weights of legumes with and without lime. Figures with different vertical letter show significant differences according to Duncan Test ($P \leq 0.05$).

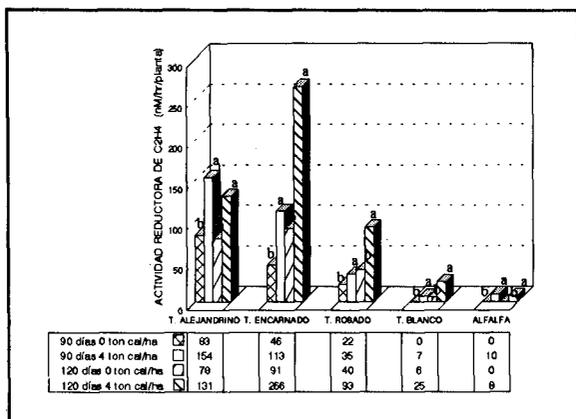


FIGURA 4. Actividad reductora de acetileno de las leguminosas con y sin encalado del suelo. Cifras con distinta letra en sentido vertical indican diferencias significativas, de acuerdo a la Prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

FIGURE 4. Acetylene reduction assay of legumes with and without lime. Figures with different vertical letter show significant differences according to Duncan Test ($P \leq 0.05$).

Richardson y otros (1988), en estudios con *T. repens*, obtuvieron marcadas disminuciones en el número de nódulos, aún a bajas concentraciones de aluminio, pero con bajo pH (menor a pH 4,5). Sin embargo, la influencia precisa del Al en la simbiosis no está bien entendida. Estos mismos autores mostraron que el Al afecta el crecimiento de *R. trifolii* tanto en solución como en la rizósfera de la planta.

Los daños causados por el exceso de aluminio directamente sobre el huésped, tales como cambios en la morfología de la superficie de las raíces y disminución de la formación de pelos radicales, interferirán también con los procesos de infección y formación de nódulos.

La toxicidad del aluminio para las leguminosas es importante en suelos ácidos que contienen cantidades elevadas de Al intercambiable. La mayoría de los datos señalados por la literatura se han obtenido en soluciones nutritivas con Al, por lo que deben ser interpretados con precaución, debido a las dificultades en mantener concentraciones constantes de este elemento en solución, pero pueden obtenerse algunas conclusiones generales. El crecimiento de las leguminosas sensibles, tales como *Medicago sativa*, está limitado por concentraciones de 20 μM de Al en solución, y se inhibe completamente por soluciones con concentraciones de 80 μM de Al (Andrew y otros, 1973). La captación y translocación de fósforo y calcio puede ser reducido en presencia de aluminio (Andrew y otros, 1973; Clarkson, 1965; Munns, 1965).

En cambio, en presencia de dosis adecuadas de cal (4 ton/ha), hay un importante aumento de la materia seca producida, del número y peso de los nódulos y de la actividad de la enzima nitrogenasa, puesto que el aluminio tóxico de la solución del suelo ha sido neutralizado por el carbonato aplicado por dicha enmienda, proporcionando así un ambiente favorable para que el mecanismo de la fijación simbiótica de nitrógeno opere eficientemente (Munns, 1970; Urzúa, 1991). De esta manera, las leguminosas pueden hacer uso de un nitrógeno gratuito proveniente del aire, con el consiguiente ahorro de fertilizantes nitrogenados para el sistema productivo.

Las especies vegetales y los genotipos dentro de una especie varían ampliamente en su tolerancia al aluminio. Esta tolerancia puede ser exhibida en términos de mejor crecimiento de las partes radical y aérea, lo que se traduce en una utilización más eficiente de nutrientes. Wright (1989), señala que el uso de plantas tolerantes al Al ofrece una solución parcial a problemas de toxicidad de Al en suelos donde la aplicación de cal no es factible ni económica ni técnicamente.

Es interesante señalar que las diferentes especies de leguminosas forrajeras presentan distintos grados de sensibilidad a la toxicidad por aluminio en suelos ácidos. Esto también se aprecia en los resultados obtenidos, donde la alfalfa aparece como la especie más afectada por esta condición de acidez, puesto que, prácticamente, desaparece en

las parcelas que no recibieron cal. En cambio, los tréboles anuales, aparentemente, mostrarían una mayor tolerancia relativa al aluminio del suelo, lo que concuerda con lo indicado por Flis y otros (1993). De acuerdo a los resultados, la sensibilidad al Al de las especies, en orden decreciente, sería trébol alejandrino, trébol encarnado, trébol rosado, trébol blanco y alfalfa.

A pesar que las plantas leguminosas tienen una tolerancia menor a la acidez, se ha demostrado que *Medicago sativa* L., *Glycine wightii* L. y algunas especies de tréboles pueden crecer bien en soluciones de cultivo a pH 4,0. Estos hallazgos sugieren que una selección apropiada de cepas de *Rhizobium*, para tolerancia a la acidez, puede mejorar la nodulación y la efectividad simbiótica en suelos ácidos.

RESUMEN

En la temporada 1993, se realizó un experimento de campo, en un suelo transicional de la IX Región, caracterizado por su gran acidez, para estudiar el efecto del carbonato de calcio en el establecimiento de trébol encarnado, trébol alejandrino, trébol rosado, trébol blanco y alfalfa, y su impacto sobre la fijación simbiótica de nitrógeno.

En ausencia de cal, se restringió drásticamente la producción de materia seca y se obtuvo un bajo recuento y peso de nódulos formados en las raíces. Además, se constató una baja actividad de la enzi-

ma nitrogenasa en los nódulos de las plantas, evaluada a través de la técnica reducción de acetileno.

En cambio, en presencia de cal (4 ton/ha), hay un importante y significativo aumento de los parámetros señalados anteriormente, puesto que el aluminio tóxico de la solución del suelo ha sido neutralizado por el carbonato aplicado por dicha enmienda.

Palabras claves: leguminosas forrajeras, suelo, acidez, fijación de nitrógeno.

LITERATURA CITADA

- ALVA, A.; EDWARDS, D.; ASHER, C. and BLAMEY, F. 1986. Effects of phosphorus/aluminium molar ratio and calcium concentration on plant response to aluminium toxicity. *Soil Science Society American Journal* 50: 133-137.
- ANDREW, C.; JOHNSON, A. and SANDLAND, R. 1973. Effect of aluminium on growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. *Australian Journal of Agricultural Research* 24: 325-339.
- CARVALHO, M. DE; EDWARDS, D; ANDREW, C. and ASHER, C. 1981. Aluminium toxicity, nodulation, and growth of *Stylosanthes* species. *Agronomy Journal* 73: 261-265.
- CLARKSON, D. 1965. The effect of aluminium and other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annals of Botany* 29: 309-315.
- COOPER, J.E., WOOD, M. and HOLDING, A. 1983. The influence of soil acidity factors on rhizobia. In: Jones, D.G. and Davies, D.R. (ed.). *Temperate legumes. Physiology, genetics and nodulation*. Boston, Pitman, p.: 319-335.
- FAGERIA, N., BALIGAR, V. and WRIGHT, R. 1988. Aluminum toxicity in crops plants. *Journal of Plant Nutrition* 11(3): 303-319.
- FLIS, S.; GLENN, A. and DILWORTH, M. 1993. The interactions between aluminium and root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 403-417.
- HARDY, R., BURNS, R. and HOLSTEN, R., 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47-81.
- HOLDING, A. and LOWE, J. 1971. Some effects of acidity and heavy metals on the Rhizobium-leguminous plant association. *Plant and Soil, Special Volume*: 153-166.
- LIE, T.A. 1969. The effect of low pH on different phases of nodule formation in pea plants. *Plant and Soil* 31: 391-406.
- MUNNS, D.N. 1965. Soil acidity and growth of a legume. *Australian Journal of Agricultural Research* 16: 733-766.
- MUNNS, D.N. 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid-sensitive steps. *Plant and Soil* 28: 129-146.
- MUNNS, D.N. 1970. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection. *Plant and Soil* 32: 90-102.
- RICHARDSON, A.; DJORDJEVIC, M.; ROLFE, B. and SIMPSON, R. 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil* 109: 37-47.
- SADZAWKA R., ANGELICA y CAMPILLOR., RICARDO. 1993. Problemática de la acidez de los suelos de la IX Región. I. Génesis y características del proceso. En: Campillo, R. (ed.). *Acidez de los suelos en la región de la Araucanía*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Chile), Estación Experimental Carillanca (Temuco). Serie Carillanca Nº 38. p.: 1-8.

URZUA, H. 1991. Efecto de la acidez del suelo sobre la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras. En: Celis, S. (ed.). Acidez y encalado de suelos en la región de Los Lagos. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Chile), Estación Experimental Remehue (Osorno). Serie Remehue Nº 15. p.: 97-110.

VANCE, C. 1991. Root-bacteria interactions. Symbiotic nitrogen fixation. In: Waisel, Y.; Amsan, E. and Kafkafi, V. (ed.). Plants roots. The hidden half. Marcel Dekker Inc. p.: 671-701.

VINCENT, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, Sidney, Australia. 288 p.

WRIGHT, R. 1989. Soil aluminium toxicity and plant growth. Commun. In. Soil Sci. Plant Anal. 20: 1.479-1.497.