

## ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL $^{15}\text{N}$ <sup>1</sup>

### Estimation of biological nitrogen fixation in forage legumes using a $^{15}\text{N}$ labeling methodology<sup>1</sup>

Ricardo Campillo R.<sup>2\*</sup>, Segundo Urquiaga C.<sup>3</sup>, Inés Pino N.<sup>4</sup> y Adolfo Montenegro B.<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

The contribution of biological nitrogen  $\text{N}_2$  fixation (FBN) in four forage legumes: white clover (*Trifolium repens* L.), red clover (*Trifolium pratense* L.), subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.), with and without specific rhizobium inoculation, was evaluated by the A value isotope technique, using three grasses: oats (*Avena sativa* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) as reference crops. The study was carried out for three years on an andisol (Typic fulvudand), at the Carillanca Regional Research Center of de National Agricultural Research Institute, IX Region, Chile. The dose of N applied was 10 kg N  $\text{ha}^{-1}$  using ammonium sulfate (10 atom %  $^{15}\text{N}$  excess) for legume species, and 30 kg  $\text{ha}^{-1}$  as ammonium sulfate (5 atom %  $^{15}\text{N}$  excess) for grass species. Plant samples were analyzed for total N (Kjeldahl) and atom %  $^{15}\text{N}$  excess (optical emission spectrometry). All the three reference crops showed similar values of FBN to the legumes. The FBN capacity reached 90% in all seasons and by all the legumes. No significant influence of inoculation with rhizobium was found, except for alfalfa and only in the first season. The quantity of N fixed in all seasons was high and for all the legumes, ranging from 60 to 770 kg  $\text{ha}^{-1}$  year<sup>-1</sup>, for subterranean clover and alfalfa, respectively, confirming the great efficiency of the FBN mechanism on the forage legumes under study.

**Key words:** forage legumes, inoculation, nitrogen, isotopic techniques.

#### RESUMEN

Se estudió la contribución de la fijación biológica de  $\text{N}_2$  (FBN) en cuatro leguminosas forrajeras, trébol blanco (*Trifolium repens* L.), trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.), con y sin inoculación específica de rhizobio, mediante la metodología isotópica del Valor A, empleando tres gramíneas: avena (*Avena sativa* L.), ballica perenne (*Lolium perenne* L.) y festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) como cultivos de referencia. El estudio se llevó a cabo en un andisol (Typic fulvudand), en el Centro Regional de Investigación Carillanca, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, IX Región, Chile, durante tres temporadas. Las dosis aplicadas de N correspondieron a 10 kg  $\text{ha}^{-1}$  como sulfato de amonio (10% átomos exceso  $^{15}\text{N}$ ) para las especies leguminosas y de 30 kg  $\text{ha}^{-1}$  como sulfato de amonio (5% átomos exceso  $^{15}\text{N}$ ) para las gramíneas de referencia. En las muestras de material vegetal se analizó N total (Kjeldahl) y  $^{15}\text{N}$  (espectrometría de emisión óptica). Los tres cultivos de referencia mostraron estimaciones similares de la FBN en las leguminosas. La capacidad de FBN alcanzó el 90% en todas las temporadas y para todas las leguminosas. No se encontró efecto significativo respecto a la inoculación con rhizobium, excepto en alfalfa y sólo en la primera temporada. La cantidad de N fijado en todas las temporadas fue alta y con todas las leguminosas, variando entre 60 y 770 kg  $\text{ha}^{-1}$  año<sup>-1</sup>, para trébol subterráneo y alfalfa, respectivamente, ratificando la gran eficiencia del mecanismo de FBN en las leguminosas forrajeras en estudio.

**Palabras clave:** leguminosas forrajeras, inoculación, nitrógeno, técnicas isotópicas.

<sup>1</sup>Recepción de originales: 18 de octubre de 2001.

Trabajo presentado en el VII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Temuco, Chile, 10-13 mayo 1995.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

E-mail: rcampill@carillanca.inia.cl \*Autor para correspondencia. amontene@carillanca.inia.cl

<sup>3</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiología, Seropédica, Brasil. E-mail: urquiaga@cnpab.embrapa.br

<sup>4</sup>Comisión Chilena de Energía Nuclear, Casilla 188-D, Santiago, Chile. E-mail: ipino@cchen.cl

## INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en las leguminosas contribuye significativamente a la nutrición nitrogenada y productividad de las praderas. Por ello, es esencial implementar metodologías apropiadas para su evaluación. En la medición de la FBN de especies leguminosas se han utilizado diferentes metodologías, tales como diferencias en la acumulación de N total o el rendimiento de MS entre plantas fijadoras y no fijadoras (Vincent, 1982; Hardarson *et al.*, 1984). La técnica de reducción del acetileno (Hardy *et al.*, 1968), que ha probado ser útil para detectar sistemas de fijación de N, también tiene limitaciones debido a que mide la actividad de la enzima nitrogenasa de manera puntual y en un corto período de tiempo.

Las técnicas isotópicas del  $^{15}\text{N}$  se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones globales de la FBN, que permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera, y entregan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema leguminosa-rhizobium dado (Barea, 1991; Danso, 1995).

En la IX Región de Chile existe una amplia superficie de suelos derivados de cenizas volcánicas recientes conocidos como trumaos (andisoles) y de cenizas volcánicas antiguas denominados rojo arcillosos (ultisoles). Se ha establecido también que estos suelos presentan particularidades químicas, tales como alta retención y baja disponibilidad de P, bajos contenidos de bases principalmente de Ca, asociados a niveles tóxicos de Al de intercambio y pH, que están afectando la productividad de cultivos y praderas (Campillo, 1994).

A pesar de la importancia de las leguminosas en la producción de las praderas y en la economía del N de los sistemas pratenses, no existe información nacional precisa sobre la real capacidad de fijación de N de estas especies leguminosas. La información disponible en la actualidad es escasa, contradictoria y obtenida principalmente en forma indirecta (método de la diferencia y reducción de acetileno). Este conocimiento, así como el impacto que provoca el uso de enmiendas calcáreas y la fertilización

fosforada en la FBN de las leguminosas forrajeras, es básico para conseguir el objetivo central de lograr una eficiente fijación de N y ahorro de fertilizante nitrogenado en los ecosistemas pratenses del sur de Chile.

En Chile en general, y en la IX y X regiones en particular, existen escasos antecedentes de estimaciones de la FBN que muestren la magnitud y estacionalidad del proceso en las leguminosas de la zona, principalmente de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.). Urzúa *et al.* (1985) observaron mediante el método de la reducción del acetileno que en la X Región el aporte de la FBN al trébol blanco en mezcla con ballica perenne (*Lolium perenne* L.) era de 78 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Sin embargo, también se ha informado de valores promedio de 56 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en praderas permanentes de la provincia de Osorno (costa, llano longitudinal y precordillera andina), usando esta misma técnica (Urzúa *et al.*, 1987). Teuber (1996) usando el método de reducción de acetileno, observó valores de 97 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> como potencial de FBN para la pradera mejorada del llano central de la X Región. Cabe recordar que estas estimaciones distan bastante de las obtenidas en otras latitudes como Nueva Zelanda, donde el aporte de N por la fijación simbiótica en praderas permanentes de trébol blanco con ballica perenne fluctúa entre 100 y 300 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Ball, 1982).

El objetivo de este estudio fue cuantificar la FBN en cuatro leguminosas forrajeras utilizadas en el sur de Chile, mediante la metodología del  $^{15}\text{N}$  (Valor A), y su variación por efecto de la inoculación con rhizobium. Adicionalmente, se evaluó la factibilidad de uso de tres especies gramíneas como cultivos de referencia para la estimación del proceso de FBN de estas leguminosas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Centro Regional de Investigación Carillanca, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuaria (INIA), comuna de Vilcún (38°41' lat. Sur, 72°25' long. Oeste, 200 m.s.n.m.), cercana a la ciudad de Temuco, IX

Región, durante tres temporadas (1990-1992). El suelo corresponde a un andisol de la serie Vilcún (Typic Fulvudand) y presentaba en los primeros 7,5 cm: 29 mg kg<sup>-1</sup> de P Olsen; 13% MO; 9 cmol+ kg<sup>-1</sup> de suma de bases de intercambio y ausencia de limitaciones de acidez (pH H<sub>2</sub>O 6,2 y 0,01% de saturación de Al). Estos niveles se presentaban con escasa variación hasta los 15 cm de profundidad. Las buenas condiciones de fertilidad inicial del sitio se explican por corresponder a un suelo con rotación intensiva de cultivos anuales (raps, trigo, avena, cebada), por más de 25 años.

El diseño utilizado fue de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Los tratamientos consideraron las combinaciones factoriales de cuatro leguminosas y ausencia y aplicación de inóculo y las tres especies de gramíneas, en parcelas de 2 x 6 m. Se evaluaron cuatro especies leguminosas: trébol blanco (*Trifolium repens* L.) var. Huía; trébol rosado var. Quiñequeli; trébol subterráneo var. Mount Barker; y alfalfa var. Criolla, con y sin inoculante comercial específico. Se utilizaron los inoculantes comerciales *Rhizobium trifolii* para tréboles y *Rhizobium meliloti* para alfalfa (NITRO-FIX, Concepción, Chile), empleando 10 g de inoculante por kilogramo de semilla y goma arábiga como adherente, junto con el fungicida metalaxil (Apron, CIBA-GEIGY S.A.). Las semillas inoculadas y desinfectadas fueron peletizadas con 500 g de carbonato de calcio por kilogramo de semilla. Además, se evaluaron tres especies de gramíneas como cultivos de referencia: avena (*Avena sativa* L.) var. Nehuén; ballica perenne var. Nui y festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) var. Fawn.

El experimento se sembró en la segunda quincena de marzo con una máquina sembradora manual (Planet Junior), a 20 cm entre hileras. Las dosis de semilla fueron 4 kg ha<sup>-1</sup> de trébol blanco, 12 kg ha<sup>-1</sup> de trébol rosado, 10 kg ha<sup>-1</sup> de trébol subterráneo, 20 kg ha<sup>-1</sup> de alfalfa, 120 kg ha<sup>-1</sup> de avena y 15 kg ha<sup>-1</sup> de ballica perenne y festuca. Inicialmente se aplicó una fertilización base de 50 kg ha<sup>-1</sup> de P (superfosfato triple) y 125 kg ha<sup>-1</sup> de K (sulfato de potasio). En marzo de las temporadas siguientes se refertilizó de mantención con estas mismas dosis, complementándose con 125 kg ha<sup>-1</sup> de K (muriato de potasio) en octubre y 70 kg ha<sup>-1</sup> de

K y S y 60 kg ha<sup>-1</sup> de Mg (Sulpomag) en diciembre de cada año. El experimento fue regado en forma gravitacional desde diciembre a marzo de cada temporada, reponiéndose el 100% de la evaporación de bandeja cada 10 días. La producción de MS se evaluó en la macroparcela de producción, cosechándose 4 m<sup>2</sup> a través de cortes con una máquina segadora de barra autopropulsada. Las muestras de forraje verde se secaron en horno con ventilación forzada de aire a 65°C hasta alcanzar peso constante, para determinar su contenido de MS. En la primera temporada se hicieron cuatro cortes, mientras que durante la segunda y tercera temporada se obtuvieron cinco cortes.

### **Evaluación de la fijación de N<sub>2</sub> con la técnica isotópica del <sup>15</sup>N**

En microparcelas de 1 m<sup>2</sup>, localizadas dentro de la macroparcela, se aplicaron dosis de N de 10 kg ha<sup>-1</sup> como sulfato de amonio (10% átomos exceso (a.e.) <sup>15</sup>N) para las especies leguminosas y de 30 kg ha<sup>-1</sup> como sulfato de amonio (5% a.e. <sup>15</sup>N) para las gramíneas de referencia (Labandera *et al.*, 1988; Hardarson y Danso, 1990). El fertilizante marcado fue aplicado en solución en la microparcela cada dos cortes. La microparcela fue desplazada dentro de la macroparcela cada dos cortes, para seguir la secuencia de marcación. El resto de la macroparcela recibió la misma dosis de fertilizante, pero sin <sup>15</sup>N. En cada corte se colectó un área de 0,9 x 0,9 m dentro de la microparcela. Las muestras de forraje verde de cada especie, por separado, se secaron en horno con ventilación forzada de aire a 65°C hasta alcanzar peso constante, para determinar su contenido de MS. En una submuestra de material vegetal se analizó N total (Kjeldahl) y la relación isotópica <sup>15</sup>N <sup>14</sup>N<sup>-1</sup> (espectrometría de emisión óptica, NOI-6, Leipzig, Alemania). Para el cálculo del N fijado por las leguminosas solas, se utilizó la metodología del valor A (Hardarson y Danso, 1990; Danso, 1995). Los datos obtenidos fueron sometidos a ANDEVA y cuando hubo diferencias significativas se utilizó la prueba de contrastes ortogonales para comparación de las medias de tratamiento, usando el programa estadístico SAS version 6.12 (SAS, 1989). La alfalfa se estableció en primavera por ser la época de siembra más recomendable. Ello determinó que en la primera temporada sólo hubo dos cortes para las

evaluaciones, de los cuales únicamente se marcó con  $^{15}\text{N}$  el segundo corte.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al final de la primera temporada la práctica de inoculación de las semillas de leguminosas con rhizobio específico no mostró efectos significativos en las producciones acumuladas de MS de trébol blanco, trébol subterráneo y trébol rosado, pero sí tuvo efecto ( $P < 0,01$ ) en la alfalfa (Cuadro 1). En las temporadas posteriores tampoco hubo efecto de la inoculación en ninguna de las leguminosas. Ello indicaría que el suelo presentaba inicialmente una población adecuada de rhizobio para estas especies, a excepción de la alfalfa, situación que posteriormente se revirtió, una vez que la cepa inoculada alcanzó predominancia en el suelo.

Un factor fundamental en la aplicación exitosa de las técnicas isotópicas con  $^{15}\text{N}$  para estimar la capacidad de FBN de las leguminosas, es la elección del cultivo de referencia (Danso *et al.*, 1993; Danso, 1995). Para resolver esta interrogante, durante la primera temporada se evaluaron tres especies gramíneas que normalmente se siembran en la región. Al comparar la FBN (%) de las leguminosas basado en el uso de las tres especies gramíneas como referencia (Cuadro 2), se observó una gran similitud en los valores estimados, independiente-

mente de la gramínea utilizada como referencia. Adicionalmente, los valores de fijación fueron elevados en todas las leguminosas, variando entre 80 y 95%, al margen de la inoculación. Es importante destacar que los valores de coeficiente de variación obtenidos en cada corte fueron muy pequeños y similares también para todas las gramíneas.

Cuando se estableció la comparación del manejo con o sin inoculación de las especies leguminosas, para la estimación de la FBN mediante contrastes ortogonales, se observó una respuesta similar entre los tres cultivos de referencia utilizados (Cuadros 2 y 3). Con los tres cultivos de referencia se detectó efecto significativo ( $P < 0,01$ ) de la inoculación solamente para trébol subterráneo, situación que en las temporadas siguientes desapareció. Con las otras leguminosas no hubo efecto de la inoculación sobre la FBN. Está ampliamente establecido que la selección del cultivo de referencia es menos crítica en la medición de la FBN en cultivos altamente fijadores (Hardarson y Danso, 1990; Danso *et al.*, 1993). De acuerdo a estos resultados, se decidió utilizar ballica perenne como cultivo de referencia para la estimación de la FBN, puesto que su ciclo de desarrollo y producción se asemeja más al de las leguminosas estudiadas en este experimento. Adicionalmente, la literatura señala ampliamente a esta especie como un cultivo de referencia adecuado para estas especies leguminosas (Labandera

**Cuadro 1. Contrastes ortogonales de producciones acumuladas de materia seca ( $\text{t ha}^{-1}$ ) de las especies leguminosas forrajeras estudiadas**

**Table 1. Orthogonal contrasts of accumulated dry matter production ( $\text{t ha}^{-1}$ ) of the studied forage legume species**

Especie	1ª temporada			2ª temporada			3ª temporada		
	Inoc.	Sin inoc.	Prueba de F	Inoc.	Sin inoc.	Prueba de F	Inoc.	Sin inoc.	Prueba de F
Trébol blanco	7,38	7,33	NS	12,16	11,98	NS	10,40	10,07	NS
Trébol rosado	13,82	14,70	NS	9,09	9,97	NS	9,07	9,06	NS
Trébol subterráneo	2,72	3,54	NS	2,50	3,03	NS	6,82	6,01	NS
Alfalfa	7,27	3,20	**	21,39	21,38	NS	21,34	21,06	NS
Ballica perenne		7,78			5,60			5,23	
Festuca		5,36			5,77			5,80	
Avena		2,74			s.i.			s.i.	
CV %	10,8			9,8			9,8		

\*\*( $P < 0,01$ ); NS: no significativo; Inoc: inoculado; Sin inoc.: no inoculado; CV: coeficiente de variación; s.i.: sin información.

**Cuadro 2. Contribución estimada de la fijación biológica de nitrógeno (%) en las cuatro especies leguminosas forrajeras usando tres especies de gramíneas como referencia, durante la primera temporada**  
**Table 2. Estimated contribution of biological nitrogen fixation (%) in the four forage legumes using three grass species as reference crops, during the first season**

Especie	Inoc.	Ballica perenne				Festuca			Avena	
		Cortes				Cortes			Cortes	
		1	2	3	4	1	2	3	1	2
Trébol blanco	Con	82,5	90,5	89,9	85,8	86,0	89,9	89,6	92,0	88,6
	Sin	77,5	90,8	90,6	87,1	82,8	90,2	90,6	89,9	88,9
Trébol rosado	Con	86,6	92,3	93,9	83,9	89,3	91,8	93,7	93,7	90,6
	Sin	85,8	91,3	93,9	87,4	88,4	90,8	93,7	93,4	89,6
Trébol subterráneo	Con	73,4	89,6	s.i.	s.i.	77,4	88,8	s.i.	87,3	87,7
	Sin	80,4	93,1	s.i.	s.i.	84,3	92,6	s.i.	91,0	91,6
Alfalfa	Con	s.i.	s.i.	s.i.	95,6	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
	Sin	s.i.	s.i.	s.i.	95,2	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
CV %		4,3	1,4	1,0	3,3	3,4	1,5	0,8	1,6	1,7

CV: coeficiente de variación; Inoc: inoculado; s.i.: sin información.

**Cuadro 3. Contrastes ortogonales de los valores de la fijación biológica de nitrógeno (%) de las leguminosas forrajeras con y sin inoculación, con diferentes cultivos de referencia**  
**Table 3. Orthogonal contrasts of values for biological nitrogen fixation (%) of the forage legumes with and without inoculation, with different reference crops**

Corte (fecha)	Leguminosa	Ballica	Festuca	Avena
		Significancia de inoculación		
1 (15/10/90)	Trébol blanco	NS	NS	NS
	Trébol rosado	NS	NS	NS
	Trébol subterráneo	*	**	**
2 (27/11/90)	Trébol blanco	NS	NS	NS
	Trébol rosado	NS	NS	NS
	Trébol subterráneo	**	**	**
3 (16/01/91)	Trébol blanco	NS	NS	s.i.
	Trébol rosado	NS	NS	s.i.
4 (07/03/91)	Trébol blanco	NS	s.i.	s.i.
	Trébol rosado	NS	s.i.	s.i.
	Alfalfa	NS	s.i.	s.i.

\*\*( $P < 0,01$ ); \*( $P < 0,05$ ) según prueba de F; NS: no significativo; s.i.: sin información.

*et al.*, 1988; Hardarson *et al.*, 1988; Hardarson y Danso, 1990).

En las siguientes temporadas los índices de FBN (%) se mantuvieron elevados, confirmando así la alta eficiencia de operación del mecanismo biológico en las condiciones del experimento (Cuadros 4 y 5). Durante la tercera y última temporada de evaluación se observaron algunos efectos significativos ( $P < 0,05$ ) del manejo de la inoculación, principalmente en el tercer corte (Cuadro 5). Sin embargo, no fue posible establecer aquí un patrón coherente de respuesta. Es importante recordar que esta situación se expresó en la tercera temporada de evaluación de las parcelas, cuando el trébol rosado presentaba una declinación natural en su población de plantas. También pudo haber influido la variación en la cobertura del suelo alcanzada por las leguminosas al momento del muestreo.

El N fijado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) por las distintas leguminosas a lo largo de las tres temporadas se desglosa en el Cuadro 6. Con excepción de la primera temporada en trébol subterráneo y alfalfa, no hubo efecto de la inoculación en este índice de FBN, lo cual confirma los resultados de porcentajes de FBN. En el caso de trébol subterráneo (dos cortes acumulados), el mejor comportamiento sin inoculación es difícil de explicar con los datos disponibles; sin embargo, este efecto desapareció en las dos temporadas siguientes. Respecto a la alfalfa (un solo corte marcado), es importante recordar que el sitio experimental provenía de un sistema de rotación intensiva de cultivos anuales e históricamente no registraba siembras de alfalfa, razón por la cual el suelo no presentaba infección natural con cepas de rhizobio específicas para esta leguminosa. Ello explicaría el efecto inicial de la inoculación en la primera temporada.

**Cuadro 4. Contrastes ortogonales de la fijación biológica de nitrógeno (%) por las cuatro leguminosas forrajeras durante la segunda temporada**

**Table 4. Orthogonal contrasts of biological nitrogen fixation (%) for the four forage legumes during the second season**

Corte (fecha)	Leguminosa	Inoculación		Prueba de F
		Con	Sin	
1 (09/05/91) CV: 3,6%	Trébol blanco	84,6	86,1	NS
	Trébol rosado	85,5	82,9	NS
	Alfalfa	89,5	89,9	NS
2 (13/11/91) CV: 1,2%	Trébol blanco	93,1	91,5	NS
	Trébol rosado	95,5	96,5	NS
	Trébol subterráneo	95,3	94,1	NS
	Alfalfa	94,7	94,9	NS
3 (03/01/92) CV: 3,7%	T. blanco	92,4	91,7	NS
	T. rosado	94,4	95,7	NS
	T. subterráneo	82,0	78,5	NS
	Alfalfa	94,5	94,8	NS
4 (07/03/92) CV: 2,5%	Trébol blanco	85,9	89,3	NS
	Trébol rosado	97,5	96,8	NS
	Alfalfa	94,5	94,8	NS
5 (06/04/92) CV: 1,9%	Trébol blanco	88,4	91,1	NS
	Trébol rosado	98,0	97,5	NS
	Alfalfa	90,3	88,5	NS

Cultivo de referencia: ballica perenne; CV: coeficiente de variación; NS: no significativo.

**Cuadro 5. Contrastes ortogonales de la fijación biológica de nitrógeno (%) por las cuatro leguminosas forrajeras durante la tercera temporada****Table 5. Orthogonal contrasts of biological nitrogen fixation (%) for the four forage legumes during the third season**

Corte (fecha)	Leguminosa	Inoculación		Prueba de F
		Con	Sin	
1 (01/11/92) CV: 4,4%	Trébol blanco	94,4	90,1	NS
	Trébol rosado	87,4	96,9	*
	Trébol subterráneo	94,3	96,3	NS
	Alfalfa	90,4	89,6	NS
2 (15/12/92) CV: 2,7%	Trébol blanco	95,9	92,1	NS
	Trébol rosado	93,6	94,3	NS
	Trébol subterráneo	90,4	88,6	NS
	Alfalfa	91,6	91,8	NS
3 (25/01/93) CV: 4,0%	Trébol blanco	82,5	85,4	**
	Trébol rosado	94,1	90,0	*
	Alfalfa	88,0	85,2	*
4 (08/03/93) CV: 2,9%	Trébol blanco	82,1	92,4	NS
	Trébol rosado	91,8	96,9	NS
	Alfalfa	89,2	95,2	NS
5 (28/04/93) CV: 2,5%	Trébol blanco	87,2	88,0	NS
	Trébol rosado	94,5	91,9	NS
	Alfalfa	80,4	78,5	NS

Cultivo de referencia: ballica perenne; CV: coeficiente de variación; \*\*( $P < 0,01$ ); \*( $P < 0,05$ ); NS: no significativo.

Estos resultados ilustran la gran eficiencia del mecanismo de FBN en todas estas especies leguminosas. El trébol subterráneo, como especie anual de resiembra, presentó la mayor variabilidad de N fijado (60 a 191 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), debido a su mayor dependencia de las condiciones climáticas de cada temporada (Cuadro 6). Resultados similares han sido encontrados en Australia respecto de trébol subterráneo en praderas mixtas, con valores de fijación entre 2 y 206 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Peoples *et al.*, 1995).

El trébol rosado alcanzó su producción máxima durante la primera temporada (424 kg ha<sup>-1</sup>), para declinar posteriormente en razón de sus limitaciones naturales de persistencia (Cuadro 6). Heichel *et al.* (1985) informaron que en Minnesota, EE.UU., la FBN de trébol rosado fluctuó entre 69 y 133 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, con una marcada declinación a partir del segundo año.

El trébol blanco expresó su mayor potencial de fijación de N a partir de la segunda temporada donde alcanzó los 396 kg ha<sup>-1</sup>, valores equivalentes o superiores a aquellos reportados en Nueva Zelanda (Ball, 1982) y Gran Bretaña (Rennie, 1986; Marriot y Haystead, 1993). En andisoles regados de la IX Región, también mediante la técnica de dilución isotópica, se determinó que la FBN en trébol blanco de praderas permanentes fluctuó entre 218 y 272 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Campillo y Barrientos, 2000). Estas cifras ratifican la alta eficiencia que logra expresar este proceso biológico debido a la ausencia de limitaciones de fertilidad y riego.

Finalmente, la alfalfa incrementó sustancialmente sus índices de fijación de N, alcanzando los 770 kg ha<sup>-1</sup> al cabo de la tercera temporada. Estos valores son notoriamente superiores a mediciones realizadas en el extranjero. Hardarson *et al.* (1988), en Seibersdorf, Austria, indicaron que la alfalfa fijó

**Cuadro 6. Contrastes ortogonales de la fijación biológica de nitrógeno (kg ha<sup>-1</sup>) en las cuatro leguminosas forrajeras****Table 6. Orthogonal contrasts of biological nitrogen fixation (kg ha<sup>-1</sup>) in four forage legumes**

Leguminosa	Inoculación		Prueba de F
	Con	Sin	
<b>Primera temporada</b>			
Trébol blanco	232,1	251,3	NS
Trébol rosado	423,8	415,7	NS
Trébol subterráneo	61,6	133,1	**
Alfalfa	158,2	88,0	**
(CV: 13,4%)			
<b>Segunda temporada</b>			
Trébol blanco	395,8	395,8	NS
Trébol rosado	291,9	326,0	NS
Trébol subterráneo	60,2	79,6	NS
Alfalfa	669,4	665,5	NS
(CV: 11,8%)			
<b>Tercera temporada</b>			
Trébol blanco	368,6	352,9	NS
Trébol rosado	311,6	305,4	NS
Trébol subterráneo	190,6	147,4	NS
Alfalfa	770,5	742,2	NS
(CV: 9,0 %)			

CV: coeficiente de variación; \*\*( $P < 0,01$ ); NS: no significativo.

hasta 378 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. En Minnesota, EE.UU., se encontró que durante el año de establecimiento la alfalfa fijó 160 a 177 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, mientras que en los años siguientes alcanzó una FBN de 224 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Heichel *et al.*, 1984). Los valores medidos en suelos de la IX Región demuestran el gran potencial de estas leguminosas forrajeras para acumular N en los ecosistemas ganaderos, mediante este eficiente mecanismo biológico, cuando se proporcionan las condiciones adecuadas de nutrición, riego y manejo.

Se deben destacar las diferencias que alcanzó el coeficiente de variación del N fijado (%) (Cuadros 4 y 5) y N fijado (kg ha<sup>-1</sup>) por las distintas leguminosas (Cuadro 6). El N fijado (kg ha<sup>-1</sup>) presentó mayor variabilidad en los coeficientes debido a que en su cálculo se consideran variables de producción, las cuales siempre presentan una mayor variación. En cambio, el porcentaje de FBN es independiente de las variables de rendimiento, pre-

sentando por ello una escasa variación porcentual. Estos resultados son coincidentes con aquellos reportados por la literatura (Labandera *et al.*, 1988; Danso *et al.*, 1993).

Respecto del total de N acumulado por las leguminosas en las tres temporadas (Cuadro 7), se repite la situación ya analizada para los índices de FBN, donde solamente el trébol subterráneo y la alfalfa (primera temporada) mostraron efectos ( $P < 0,01$ ) por el manejo de la inoculación. En este caso son válidas las mismas razones ya expuestas para los índices de FBN, puesto que cerca de 90% del total de N acumulado por las leguminosas proviene del aire. Cabe recordar que el N acumulado por las leguminosas durante la temporada proviene fundamentalmente del mecanismo de FBN, del N-fertilizante utilizado para la marcación del suelo y del suministro de N que realiza el suelo en forma natural (Hardarson y Danso, 1990; Danso, 1995). Destaca nuevamente la gran cantidad de N total

**Cuadro 7. Contrastes ortogonales del N total acumulado (kg ha<sup>-1</sup>) en las cuatro leguminosas forrajeras**  
**Table 7. Orthogonal contrasts of total accumulated N (kg ha<sup>-1</sup>) in the four forage legumes**

Leguminosa	Inoculación		Prueba de F
	Con	Sin	
<b>Primera temporada</b>			
Trébol blanco	262,7	283,4	NS
Trébol rosado	471,1	462,8	NS
Trébol subterráneo	68,6	143,4	**
Alfalfa	255,3	107,4	**
(CV: 13,4%)			
<b>Segunda temporada</b>			
Trébol blanco	442,2	437,9	NS
Trébol rosado	305,3	341,4	NS
Trébol subterráneo	64,3	86,6	NS
Alfalfa	719,3	722,3	NS
(CV: 11,8%)			
<b>Tercera temporada</b>			
Trébol blanco	412,4	391,4	NS
Trébol rosado	339,1	322,1	NS
Trébol subterráneo	204,5	157,3	NS
Alfalfa	867,0	827,6	NS
(CV: 9,0 %)			

Cultivo de referencia: ballica perenne.

CV: coeficiente de variación; \*\*( $P < 0,01$ ); NS: no significativo.

acumulado en la biomasa de estas leguminosas. Las mayores acumulaciones de N total por especie en las distintas temporadas fueron: alfalfa 867 kg ha<sup>-1</sup>; trébol rosado 471 kg ha<sup>-1</sup>; trébol blanco 442 kg ha<sup>-1</sup> y trébol subterráneo 204 kg ha<sup>-1</sup> (Cuadro 7).

### CONCLUSIONES

Las buenas condiciones de fertilidad del suelo y el riego permitieron alcanzar altas producciones acumuladas de MS en las leguminosas estudiadas sin efectos por la inoculación, salvo con la alfalfa y sólo durante el primer año. Los tres cultivos de referencia mostraron estimaciones similares de la FBN de las leguminosas. No obstante, se optó por ballica perenne var. Nui, puesto que su ciclo de desarrollo y producción se asemeja más a las leguminosas estudiadas.

El porcentaje de FBN fue elevado en todas las temporadas y con todas las leguminosas, alcanzando 90% en promedio. No se observó efecto ( $P < 0,05$ ) de la inoculación sobre el porcentaje de FBN, salvo del trébol subterráneo en el primer año. La FBN (kg ha<sup>-1</sup>) fue alta en todas las temporadas y con todas las leguminosas, fluctuando entre 232 y 396 kg ha<sup>-1</sup> en el trébol blanco, 292 y 424 kg ha<sup>-1</sup> para trébol rosado, 60 a 191 kg ha<sup>-1</sup> en el trébol subterráneo, y entre 88 y 770 kg ha<sup>-1</sup> para alfalfa. Estos valores ratifican la gran eficiencia del mecanismo biológico de fijación de N con todas las leguminosas estudiadas. Los resultados anteriores indican que bajo las condiciones de suelo y clima del ensayo, la inoculación de las semillas no expresó mayor eficiencia respecto de las cepas nativas presentes en el suelo.

## RECONOCIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Organismo Internacional de Energía Atómica en la realización de este proyecto (CHI 5/018), en especial al Dr. Felipe Zapata.

Asimismo, se agradece al Laboratorio Técnicas Nucleares en Agricultura de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, por la realización de la analítica isotópica.

## LITERATURA CITADA

- Ball, R. 1982. Nitrogen balances in intensively managed pasture systems. p. 47-66. *In* P. W. Gandar (ed.). Nitrogen balances in New Zealand Ecosystems, Department of Scientific & Industrial Research (DSIR), Palmerston, New Zealand.
- Barea, J. 1991. Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de  $^{15}\text{N}$ . Vol. II. Fijación de N y micorrizas. p. 105-124. *In* J. Olivares y J. Barea (eds.). Fijación y movilización biológica de nutrientes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, RAYCAR S.A., Madrid, España.
- Campillo, R. 1994. Fertilización y uso de enmiendas en alfalfa. p. 103-124. Serie Remehue Nº 53. *In* Campillo, R. y Bortolameolli, G. (eds.). Corrección de la fertilidad y uso de enmiendas en praderas y cultivos forrajeros. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Chile.
- Campillo, R., y L. Barrientos. 2000. Potencial de fijación simbiótica de nitrógeno en ecosistemas con leguminosas forrajeras en el sur de Chile. p. 89-100. *In* J. J. Peña (ed.). La fijación biológica de nitrógeno en leguminosas en América Latina y El Caribe: el aporte de las técnicas nucleares. Arreglos Regionales Cooperativos para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología en América Latina (ARCAL), Irapuato, Guanajuato, México.
- Danso, S.K.A. 1995. Assessment of biological nitrogen fixation. *Fert. Res.* 42:33-41.
- Danso, S.K.A., G. Hardarson, and F. Zapata. 1993. Misconceptions and practical problems in the use of  $^{15}\text{N}$  soil enrichment techniques for estimating  $\text{N}_2$  fixation. *Plant Soil* 152:25-52.
- Hardarson, G. and S.K.A. Danso. 1990. Use of  $^{15}\text{N}$  methodology to assess biological nitrogen fixation. p. 129-160. *In* G. Hardarson (ed.). Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Training Course Series Nº 2. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Hardarson, G., S.K.A. Danso, and F. Zapata. 1988. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-raygrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. *Crop Sci.* 28:101-105.
- Hardarson, G., F. Zapata, and S.K.A. Danso. 1984. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using  $^{15}\text{N}$  methodology. *Plant Soil* 82:369-375.
- Hardy, R.W.F., R.D. Holsten, E.K. Jackson, and R.C. Burns. 1968. The  $\text{C}_2\text{H}_2$ - $\text{C}_2\text{H}_4$  assay for  $\text{N}_2$  fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- Heichel, G., D. Barnes, C. Vance, and K. Henjum. 1984.  $\text{N}_2$  fixation, and N and dry matter partitioning during a 4-year alfalfa stand. *Crop Sci.* 24:811-815.
- Heichel, G., C. Vance, D. Barnes, and K. Henjum. 1985. Dinitrogen fixation, and N and dry matter distribution during 4 year stands of birdsfoot trefoil and red clover. *Crop Sci.* 25:101-105.
- Labandera, C., S.K.A. Danso, D. Pastorini, S. Curbelo, and V. Martín. 1988. Nitrogen fixation in a white clover-fescue pasture using three methods of nitrogen-15 application and residual nitrogen-15 uptake. *Agron. J.* 80:265-268.
- Marriot, C., and A. Haystead. 1993. Nitrogen fixation and transfer. p. 245-264. *In* A. Davies, R. D. Baker, S. A. Grant and A. S. Laidlaw (eds.). Sward Measurement Handbook. 2<sup>nd</sup> ed. British Grassland Society, Reading, United Kingdom.
- Peoples, M., D. Herridge, and J. Ladha. 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil* 174:3-28.
- Rennie, R.J. 1986. Advantages and disadvantages of nitrogen-15 isotope dilution to quantify dinitrogen fixation in field-grown legumes. A critique. p. 43-58. *In* R.D. Hauck and R.W. Weaver (eds.). Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification. Special Publication Nº 8. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.

- SAS. 1989. User's Guide, Version 6. Volume 2. 846 p. 4<sup>th</sup> ed. SAS Institute Inc., Cary North Caroline, USA.
- Teuber, N. 1996. Fijación simbiótica de nitrógeno en diferentes zonas edafoclimáticas de la Décima Región. p. 3-17. Serie Remehue N° 62. In G. Bortolameolli (ed.). Resultados de ensayos de ganadería realizados en predios de productores GTT de la Décima Región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Chile.
- Urzúa, H., R. Bernier, y M. Ruiz. 1985. Tasas de fijación de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 12:143-145.
- Urzúa H., M. Ruiz, y R. Bernier. 1987. Fijación de nitrógeno en praderas de la X Región. *Ciencia e Investigación Agraria* 14:217-24.
- Vincent, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. 288 p. Academic Press, Sidney, Australia.

**AHORA REVISTA COMPLETA ON LINE**

# **AGRICULTURA TÉCNICA**

en tres sitios:

**<http://www.inia.cl/at/agritec.htm>**

**<http://www.scielo.cl>**

**<http://www.bioline.org.br/at/>**