

FIJACION DE NITROGENO EN ALFALFA Y SU TRANSFERENCIA AL PASTO OVILLO ASOCIADO

G SIERRA, A LAZZARI, A GARGANO

LAHBIS, Departamento de Agronomía, UNS. 8000 Bahía Blanca, Argentina.

Título corto: Fijación de nitrógeno en alfalfa asociada con pasto ovillo

Recibido 12 de mayo de 2000, aceptado 20 de octubre de 2000.

NITROGEN FIXATION IN ALFALFA AND ITS TRANSFER TO ORCHARDGRASS IN MIXED SWARD

A pot experiment was conducted a) to determine the biological N_2 -fixation by alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in monoculture and associated with orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), and b) to assess the potential transfer of fixed nitrogen from the legume to the companion grass. To calculate the proportion of nitrogen in the legume derived from the air (%NDDA) the isotope dilution technique was used. Labelled ammonium sulfate in distilled water solution was injected into each pot and provided in split applications. Plants were submitted to five harvests. Generally, the dry matter and nitrogen yields of alfalfa and orchardgrass were higher when grown in association. A higher %NDDA was observed in the legume when mixed, ranging 84-94% from the second to fourth harvest. In this period no nitrogen transfer was detected. At harvests first and fifth the difference in atom % ^{15}N enrichment between pure and mixed grass were statistically significant but a direct transfer of N from alfalfa is negligible.

Key words: Alfalfa - Orchardgrass - Nitrogen fixation - Nitrogen transfer - Isotopic dilution

INTRODUCCION

La validez del método de dilución isotópica para estimar la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas crecidas en asociación con gramíneas se basa, principalmente, en dos supuestos: a) la gramínea y la leguminosa absorben la misma proporción de nitrógeno del suelo y de nitrógeno aplicado, durante el período de crecimiento; y b) la gramínea no absorbe nitrógeno liberado por la leguminosa, bajo las condiciones de la experiencia (McAuliffe *et al.* 1958). La verificación del primer supuesto fue determinado en un trabajo previo (Sierra *et al.* 1999). La verificación del segundo supuesto se realiza comparando la composición isotópica de la gramínea en la asociación con aquella de la gramínea crecida sola. La transferencia del nitrógeno fijado desde la leguminosa a la gramínea asociada afecta el uso de esa gramínea como planta de referencia para estimar la proporción de la FBN de la leguminosa. A su vez, esa transferencia estaría indicada por un menor enriquecimiento de ^{15}N de la gramínea asociada, comparado con aquel de la gramínea crecida sola (Vallis *et al.* 1967).

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una

leguminosa extensamente utilizada como forrajera en asociación con pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.), que es perenne y cuya mezcla con alfalfa está difundida en diversas regiones de secano y regadío de nuestro país (Barbarossa *et al.* 1998). Se han descrito los efectos benéficos de diferentes leguminosas sobre las gramíneas asociadas, siendo la transferencia de nitrógeno a la gramínea la causa principal de dichos efectos (Cochran, Schlentner 1995). Sin embargo, algunos autores no han encontrado pruebas sustanciales que demuestren tal transferencia (Gil *et al.* 1997).

El principal objetivo de este trabajo fue comprobar la validez del segundo supuesto de la técnica de dilución isotópica para estimar la FBN en alfalfa asociada con pasto ovillo, a lo largo de varios cortes, evaluando la transferencia potencial de ese nitrógeno a la gramínea y en qué medida esto afecta el uso del pasto ovillo asociado como planta de referencia para estimar la FBN en alfalfa. Otro objetivo fue comparar los resultados de FBN en alfalfa asociada con los obtenidos en alfalfa pura por Sierra *et al.* (1999), en una experiencia paralela a la presente.

MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en macetas, cultivadas juntas y en las mismas condiciones del descrito por Sierra *et al.* (1999). Los tratamientos consistieron de alfalfa pura (cuatro plantas por maceta) y en mezcla con pasto ovido (dos de alfalfa y dos de pasto ovido), y pasto ovido puro (cuatro). La fertilización con $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 9,811 % a e ^{15}N , en aplicaciones parciales, del suelo de las macetas totalizó la cantidad equivalente a 25 kg N ha⁻¹. La biomasa aérea de todas las plantas se cosechó a 41 (corte I), 76 (II), 104 (III), 136 (IV), 174 (V) días desde la emergencia de la alfalfa. En la última cosecha se extrajeron las raíces. Las muestras de material vegetal fueron procesadas y analizadas para materia seca, nitrógeno total y relación isotópica. Antes de la primera cosecha, la alfalfa resultó atacada por *Phytophthora sp.*, que se controló con dos aplicaciones foliares de Afitalfosfo-K.

La proporción de nitrógeno en el pasto ovido asociado, derivado de la transferencia de nitrógeno desde la alfalfa asociada (%NDDT), fue estimada con la ecuación (Vallis *et al.* 1967):

$$\% \text{ de nitrógeno transferido} = \frac{(1 - \% \text{ a e } ^{15}\text{N gramínea asociada} / \% \text{ a e } ^{15}\text{N gramínea pura})}{100}$$

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con cinco réplicas por tratamiento y constó de dos factores: tipo de cultivo (puro y asociado) y tiempo de cosecha. Los datos se analizaron estadísticamente por ANOVA. Las comparaciones se evaluaron con los tests de rango studentizado Tukey y SNK. Se utilizó el test de la DSM para las comparaciones de la FBN de alfalfa pura respecto de la asociada.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo a datos no mostrados, las

plantas de la asociación presentaron rendimientos de materia seca estadísticamente iguales o superiores al de los respectivos cultivos puros. A su vez, en el único momento en que la materia seca de la gramínea, pura o asociada, superó a la alfalfa fue en el corte I. Esto coincidió con el ataque del hongo a la alfalfa. La leguminosa, en cambio, rindió un máximo en los cortes II y III, tanto pura como asociada. A su vez, el rendimiento de nitrógeno de ambas especies siguió la misma tendencia observada para el rendimiento de materia seca. En tres de los cinco cortes, tanto el pasto ovido como la alfalfa presentaron significativamente mayor contenido de nitrógeno en la asociación ($P < 0,01$). Esta tendencia se observó también en los rendimientos totales de ambos parámetros analizados.

En la Figura 1 se observa que las concentraciones de ^{15}N de alfalfa pura y asociada se mantuvieron constantes a lo largo del período bajo estudio. Las concentraciones de ^{15}N del pasto ovido puro y asociado mantuvieron la misma tendencia a lo largo de los cortes II, III y IV evidenciando que, al menos en ese período, ambos cultivos tendrían modelos análogos de absorción estacional de nitrógeno del suelo (+ fertilizante). El pronunciado aumento de la concentración de ^{15}N de pasto ovido, entre los dos primeros cortes, podría deberse a un aumento de la concentración de ^{15}N en la solución del suelo. La declinación entre las dos últimas cosechas coincidió con la no adición (después del corte

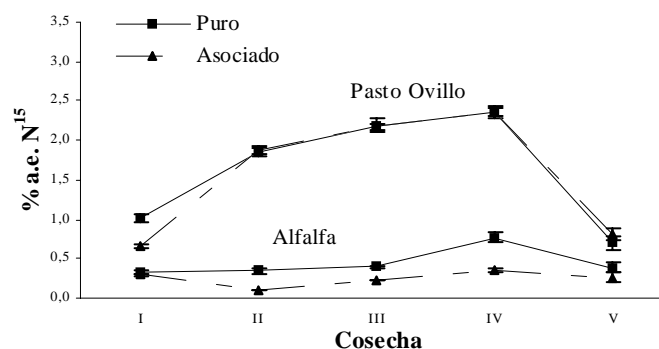


Figura 1. Concentración de ^{15}N de la biomasa aérea de alfalfa y pasto ovido puros y asociados, fertilizados con sulfato de amonio marcado. Medias de cinco réplicas. Las barras indican el error estándar de las medias.
Figure 1. Pure and mixed alfalfa and orchardgrass aerial biomass ^{15}N concentration, fertilized with labelled ammonium sulfate. Means of five replicates. Bars denote mean standard errors.

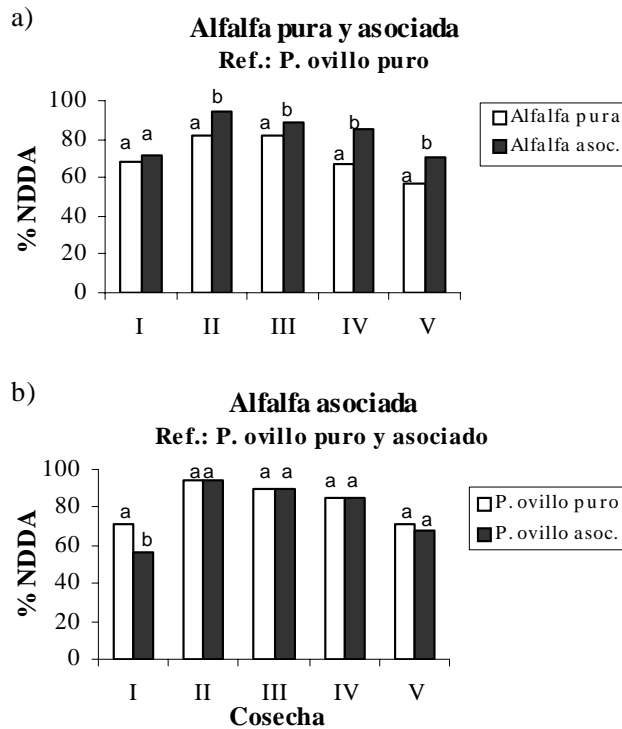


Figura 2. Porcentaje de nitrógeno fijado por: a) alfalfa pura y asociada, con pasto ovinillo puro como referencia, y b) alfalfa asociada, con pasto ovinillo puro y asociado como referencias. Los pares de barras acompañadas de letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Figure 2. Fixed nitrogen percentage by: a) pure and mixed alfalfa with pure orchardgrass as reference, and b) mixed alfalfa with pure and mixed orchardgrass as reference plants. Columns pairs accompanied by different letters indicate significantly differences ($P < 0,05$).

IV) de fertilizante marcado a las macetas, reflejando una disminución de ^{15}N del pool de nitrógeno disponible del suelo. Esta caída fue más pronunciada en la gramínea, dada su mayor dependencia de ese nitrógeno. A excepción de los cortes I y V, los estadísticamente similares enriquecimientos de ^{15}N del pasto ovinillo puro y asociado ($P > 0,10$), muestran que ambos proporcionarán similares estimaciones de %NDDA de la alfalfa asociada cuando se los usa, indistintamente, como planta de referencia. Esto se confirmó con los resultados de la Figura 2. La alfalfa asociada presentó, con excepción del corte I, un mayor %NDDA respecto del cultivo puro. El mismo comportamiento se observó en los valores de ^{15}N de alfalfa pura respecto de la asociada ($P < 0,01$) (Figura 1), debido a una mayor competencia por el nitrógeno del suelo y del fertilizante ejercida por la gramínea de la

asociación, lo que se tradujo en un mayor %NDDA de la leguminosa asociada (Figura 2). Las estimaciones de %NDDA obtenidas para el corte V fueron más bajas que aquellas de los tres anteriores, debido a que las primeras se basaron en el ^{15}N residual.

A lo largo de las cinco cosechas, la biomasa aérea de alfalfa pura acumuló 126 mg N pl^{-1} provenientes de la fijación; mientras que la leguminosa asociada acumuló un total de 180 mg N pl^{-1} . En el corte V, la composición isotópica de las raíces (+ nódulos) de alfalfa, tanto pura como asociada, no presentó diferencia significativa con aquella correspondiente a la respectiva biomasa aérea ($P > 0,10$) y, consecuentemente, a la respectiva planta entera (datos no mostrados). El mismo comportamiento se observó para la gramínea. Sin embargo, la cantidad de N_2 fijado sobre la base del análisis de la biomasa aérea solamente, subestimó a aquella de la planta

entera (incluidas raíces con sus nódulos) en un 11% (dato no mostrado). Este porcentaje podría ser mucho mayor en los cortes anteriores (Walley *et al.* 1996).

En la cosecha I, el %NDDT desde la alfalfa hacia el pasto ovinillo asociado resultó del 34 %. Aceptando que la principal ruta de transferencia de nitrógeno es probablemente indirecta, la liberación de nitrógeno a partir de la muerte de raíces es insuficiente para explicar esa magnitud del nitrógeno transferido, ya que la misma tendría lugar luego que las plantas alcancen la madurez (Haystead, Marriot 1979). También es poco probable que el %NDDT en este corte pudiera deberse a la senescencia que presentó la alfalfa al ser atacada por *Phytophthora*, dado que en los cortes II, III y IV no se detectó transferencia aparente alguna. En el último corte, existió una diferencia estadística significativa entre el enriquecimiento de ^{15}N del pasto ovinillo puro y asociado (Figura 1). Consecuentemente, se calculó una transferencia aparente de N_2 del 10,0%, considerando la biomasa aérea solamente, y del 7,8% considerando la planta entera (sin diferencia estadísticamente significativa entre ellas, $P < 0,05$). Este bajo %NDDT pudo haberse originado del liberado de restos de tejido de alfalfa o, más probablemente, de la falta de estabilización de la composición isotópica de ^{15}N residual en el pool de nitrógeno del suelo.

En conclusión, la asociación fue altamente positiva en lo que se refiere a los rendimientos de materia seca y nitrógeno, tanto de la leguminosa como de la gramínea, y a la proporción de nitrógeno fijado por la alfalfa. Sin embargo, los valores de %NDDT no indicarían transferencia de nitrógeno fijado a la gramínea acompañante, cumpliéndose el segundo supuesto de la metodología usada y validándose así el uso del pasto ovinillo asociado

como planta de referencia para estimar la FBN en alfalfa.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue subsidiado por la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/063F). Agradecemos a M. Gómez su asesoramiento en la inoculación del suelo.

REFERENCIAS

- Barbarossa R A, Zabala R N, Lizama Y. 1998. Producción de forraje de cultivares de pasto ovinillo en mezclas con alfalfa irrigadas y con pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Animal* 18:219-220.
- Cochran V L, Schlentner S F. 1995. Intercropped oat and fababean in Alaska: Dry matter production, dinitrogen fixation, nitrogen transfer, and nitrogen fertilizer response. *Agron. J.* 87:420-424
- Gil J L, Guenni O, Espinoza Y. 1997. Biological N_2 fixation by three tropical forage legumes and its transfer to *Brachiaria humidicola* in mixed swards. *Soil Biol. Biochem.* 29:999-1004.
- Haystead A, Marriot C. 1979. Transfer of legume nitrogen to associated grass. *Soil Biol. Biochem.* 11:99-104.
- McAuliffe C, Chamblee D S, Uribe-Arango H, and Woodhouse W W, Jr. 1958. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N . *Agron. J.* 50:334-337.
- Sierra G, Lázzari A, Gómez M. 1999. Uso de distintas plantas de referencia en la estimación de la fijación de nitrógeno en alfalfa por el método de dilución isotópica. *Ciencia del Suelo* 17:37-44.
- Vallis Y, Haydock K P, Ross R J, Henzell E F. 1967. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. III. The uptake of small additions of ^{15}N -labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville lucerne. *Aust. J. Agric. Res.* 18:865-877.
- Walley F L, Tomm G O, Matus A, Slinkard A E, van Kessel C. 1996. Allocation and cycling of nitrogen in an alfalfa-brome grass sward. *Agron. J.* 88:834-843.