

DETERMINACION DE N₂ ATMOSFERICO FIJADO POR SOJA
(*Glycine max* L.) MEDIANTE UTILIZACION DE ¹⁵N EN CONDICIONES
DE CAMPO*

R. A. Ghelfi (1), A. Bujan (1), M. C. Quitegui (1) y L. E. P. de Ghelfi (2)

1) División Aplicaciones Agropecuarias, Comisión Nacional de Energía Atómica.

2) Cátedra de Edafología y Manejo de Suelos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina.

RESUMEN

Se efectuó un experimento a campo (Baradero, Prov. de Buenos Aires) aplicando una técnica isotópica para determinar la cantidad de N₂ atmosférico fijado por soja. Los cálculos se hicieron multiplicando el N total en plantas fijadoras por la proporción del nutriente en ellas proveniente de fijación (x) obtenida mediante la ecuación

$$x = 1 - \frac{\% \text{ de átomos de } ^{15}\text{N} \text{ en exceso en plantas fijadoras}}{\% \text{ de átomos de } ^{15}\text{N} \text{ en exceso en plantas no fijadoras}} \quad (\text{Broeshart y Fried})$$

que indica la necesidad de utilizar controles no fijadores (soja no inoculada y sorgo en el ensayo) y un fertilizante marcado con ¹⁵N (sulfato de amonio: 20 y 100 kg N/ha en este caso).

Con la fertilización menor el N₂ fijado calculado con datos de soja no inoculada y de sorgo fue 98 y 123 kg/ha, diferencia no significativa que convalida a ambos controles; la producción de granos dió diferencia significativa, 2070 y 1540 kg/ha para soja inoculada y no inoculada.

La fertilización mayor redujo la nodulación y la fijación, no registrándose diferencia significativa de producción de granos entre soja inoculada y no inoculada.

Palabras Clave: Técnicas isotópicas; Nitrógeno- 15; Fijación simbiótica de nitrógeno; *Glycine Max* L.; Utilización de nitrógeno.

* Trabajo presentado en el X Congreso Argentino y VIII Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, 1983.

MEASUREMENT OF DINITROGEN FIXATION BY SOY BEAN (*GLYCINE MAX* L.) USING ^{15}N IN FIELD CONDITIONS

ABSTRACT

A field experiment was carried out in Baradero, Province of Buenos Aires, applying an isotopic technique to estimate the amount of dinitrogen fixed by a soy bean crop.

Calculations were made multiplying the total nitrogen in fixing plants by the proportions of the nutrients derived from the fixation (x) obtained applying the following equation:

$$x = 1 - \frac{\text{atom \% } ^{15}\text{N} \text{ excess in fixing crop}}{\text{atom \% } ^{15}\text{N} \text{ excess in non fixing crop}} \quad (\text{Broeshart, Fried})$$

that shows the needing of non fixing test-crops (non inoculated soybean and sorghum in this experiment) and the addition of a ^{15}N labelled fertilizer (ammonium sulphate: 20 and 100 kg/ha in this case).

With the low fertilization, the fixed nitrogen calculated in basis to non inoculated soy bean and sorghum, was 98 and 123 kg/ha; no significant difference that make reliable both crop tests.

The grain yield gave significant difference; 2070 and 1540 kg/ha for inoculated and non inoculated soy bean.

The high fertilization reduced the nodulation and fixation in inoculated soy bean. Grain yield was not superior in reference to non inoculated, probably because it had not the additional amount of nitrogen derived from fixation.

Key words: Isotope techniques; Nitrogen 15 ; Nitrogen symbiotic fixation; *Glycine Max* L.; Nitrogen utilization.

INTRODUCCION

Con el propósito de desarrollar y utilizar un método de medición cuantitativa de la cantidad de N_2 fijado por cultivos de leguminosas en condiciones de campo, el Organismo Internacional de Energía Atómica (O.I.E.A.) estableció un programa de carácter internacional.

Este organismo desarrolló las bases de la técnica a aplicar y estableció las normas fundamentales para la realización de los experimentos.

La importancia creciente del cultivo de soja en la Argentina, así como la de la fijación biológica de N_2 para su desarrollo y el interés que suscita la obtención de datos de carácter local, justifican la experimentación con esta metodología. No obstante que puedan existir ciertas limitaciones con la misma, esta técnica tiene la característica de ofrecer datos que involucran prácticamente la totalidad del N_2 fijado por la planta a través de su ciclo vegetativo, permitiendo discriminar el origen del nitrógeno presente en las plantas según provenga de algunas de las tres fuentes diferentes a que estas tienen acceso: fertilizante, suelo y atmósfera.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación

El ensayo se llevó a cabo en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina (Baradero, provincia de Buenos Aires) durante la campaña agrícola 1980/81, ocupando un terreno donde nunca se había sembrado soja ni otra leguminosa. El terreno fue preparado con dos aradas, una rastreada y terminación a rastrillo. El suelo es un Argiudol típico cuyos datos analíticos se incluyen en la Tabla 1.

Tratamientos y Diseño Experimental

- | | | |
|----------------------|---|-------------|
| 1) Soja no inoculada | — | 20 kg N/ha |
| 2) Sorgo | — | 20 kg N/ha |
| 3) Soja inoculada | — | 20 kg N/ha |
| 4) Soja no inoculada | — | 100 kg N/ha |
| 5) Sorgo | — | 100 kg N/ha |
| 6) Soja inoculada | — | 100 kg N/ha |

TABLA 1: Datos analíticos del suelo de Baradero, considerando 4 profundidades.

Profundidad	0-20 cm	20-35 cm	35-51 cm	51-60 cm
Clase Textural	Franco-arcilloso-limoso	Franco-arcilloso-limoso	Franco-arcilloso-limoso	Arcillo-limoso
pH (1: 1 H ₂ O)	5,5	5,4	5,3	5,3
1: 2 Cl ₂ Ca 0,01 M	4,9	4,8	4,6	4,7
Mat. Org. (Walkley Black) en %	3,03	2,4	1,44	0,95
N (total) (Kjeldahl) en %	0,14	0,12	0,08	0,06
C.I.C. (Ac. NH ₄ pH 7; 1 N) en meq/100 g	18,66	18,65	19,12	19,23
P (en B y K Nº 1) en ppm	19,66	19,67	9,93	13,30
Nitratos (Acido F.D.) en ppm	5,52	5,19	3,17	2,33
Namoniacal (Desp. con ClNa 10% pH 2,5) en ppm	5,81	5,77	8,08	6,98

El diseño experimental utilizado fue bloques al azar con 6 repeticiones. Cada parcela medía 3 m x 4,20 metros (12,60 m²) (Figura 1).

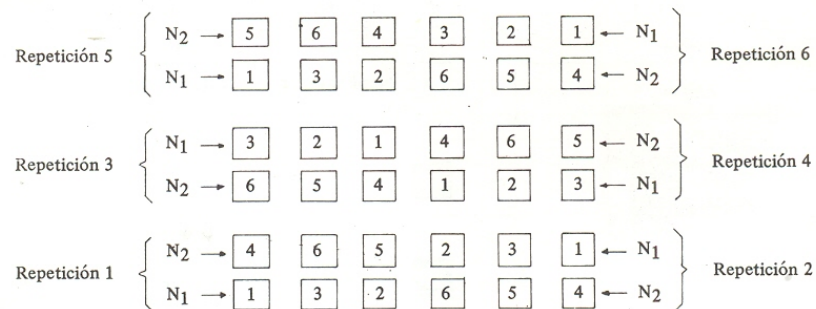


Figura 1: Esquema de la disposición de las parcelas en el campo.

El ensayo fue sembrado a mano el 17 de noviembre en hileras separadas 0,70 m con una densidad de 85 kg/ha para la soja (Williams) y de 15 kg/ha para el sorgo (NK 308).

En cada parcela se delimitó un área central de 2 m x 2,10 m donde se colocó el fertilizante marcado (Figura 2).

En el resto de la superficie de cada una, se usó una dosis igual de fertilizante, pero sin marcar. El fertilizante empleado fue sulfato de amonio y se aplicó en forma de solución con regadera. El $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que fue provisto por el O.I.E.A., tenía 5 por ciento de exceso de átomos en el nivel 1 (20 kg N/ha) y 1 por ciento de exceso de átomos de ^{15}N en el nivel 2 (100 kg N/ha). Al agregar el fertilizante, con el fin de asegurar la separación entre ambas áreas, se utilizó un marco de madera de 0,15 m de altura. A pesar de usarse dos dosis diferentes, se uniformó el volumen de agua utilizada para vehiculizar el fertilizante, de manera tal que correspondieron 60 litros para todas las parcelas (21 de noviembre).

El cultivo se raleó el 18 de diciembre dejando una planta cada 5 cm para ambas especies y simultáneamente se desmalezó a mano en las hileras de plantas y con implemento Planet Junior entre hileras.

El desmalezado se repitió cuantas veces fue necesario durante el desarrollo del cultivo. El mismo criterio se siguió para el control de plagas chinche verde (*Nezara viridula* L.), pulgón en sorgo (*Schizaphis graminum* R.) y mosquita del sorgo (*Contarinia sorghicola* Coq.), utilizando decametrina. Para evitar daños por pájaros se cubrió todo el ensayo con una red de material plástico.

Muestras de suelo y determinaciones efectuadas

Se tomaron muestras compuestas de todas las profundidades correspondientes a los horizontes del perfil hasta 60 cm (Tabla 1), en el momento de la siembra.

Muestras de plantas y determinaciones

La cantidad y peso seco de nódulos fueron determinados en las raíces de 6 plantas por parcela a los 50, 72 y 107 días desde la siembra.

La recolección de la parte aérea de las plantas de las parcelas del ensayo, se efectuó el 12 de marzo, cuando la soja alcanzó el grado de madurez fisiológica (tamaño completo de grano). La misma se realizó sobre una superficie central de 1 m x 1,40 m dentro de la subparcela fertilizada con $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 2).

El material así obtenido fue secado en estufa a 70-80°C y luego molido en "Wiley mill" utilizando tamiz de 40 mallas/pulgada.

En ese material se determinó nitrógeno total (Kjeldahl) y exceso de átomos de ^{15}N por espectrometría de masa, (Bremmer, 1965) análisis realizado por el O.I.E.A. en Viena.

La cantidad de N_2 fijada por la soja inoculada se calculó de la siguiente manera:

1) Por diferencia de contenido de N total entre la planta fijadora y las no fijadoras.

2) Utilizando la fórmula propuesta por Fried et al. (1975; 1977):

$$x = 1 - \frac{\frac{\% \text{ de átomos de } ^{15}\text{N} \text{ en exceso en plantas fijadoras}}{\% \text{ de átomos de } ^{15}\text{N} \text{ en exceso en plantas no fijadoras}}}{\frac{\text{N}^\circ \text{ total en plantas fijadoras}}{\text{N}^\circ \text{ total en plantas no fijadoras}}}$$

3) Por diferencia entre valor "A" calculado en base a la planta fijadora y valor "A" calculado en base a planta no fijadora, más cálculos complementarios según proposición de Fried y Broeshart (1975). Esta alternativa ha sido incluida con el objeto de efectuar la determinación de N_2 fijado cuando la dosis

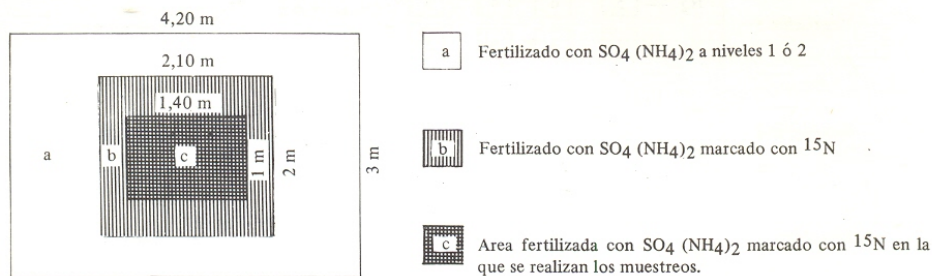


Figura 2: Esquema de una de las parcelas.

de aplicación del fertilizante marcado difiere entre el control y la planta fijadora.

La interpretación estadística de los resultados se realizó por el método de diferencia entre medias ("t" de Student), (Pimentel Gomes, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSION

La metodología empleada está basada en el hecho de que la relación entre el nitrógeno proveniente del suelo y el del fertilizante debe mantenerse constante en los controles y fijadores. Esta relación, que no puede calcularse en la variable fijadora por estar diluida por otra fuente, puede ser verificada en los controles cuyos datos no arrojan diferencias significativas (Tabla 2).

Los valores de N₂ fijado (Tabla 3) obtenidos por la fórmula de Fried y Broeshart, utilizando como testigos no fijadores la soja no inoculada ó el sorgo, no arrojan diferencias significativas, por lo cual se puede considerar que los dos cultivos utilizados como control, resultaron aptos. No obstante, en los casos en que es posible, los autores consideran conveniente la utilización de un control de la misma especie, no nodulante, por la morfología radicular, el patrón de crecimiento y el de absorción de nitrógeno que presumiblemente deben ser prácticamente idénticos.

TABLA 2: Relaciones de N proveniente del suelo y N proveniente del fertilizante.

Rel = $\frac{\text{N del suelo}}{\text{N del fertilizante}}$	Tratamientos considerados
15,32 (a)	T1
20,14 (a)	T2
2,75 (b)	T4
2,53 (b)	T5

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

TABLA 3: N fijado en kg/ha.

Tratamientos considerados	Diferencia	Método Fried	Diferencia Valor "A"
T1 vs. T3	97 (a)	98 (a)	102,2 (a)
T2 vs. T3	149 (a)	123 (a)	126 (a)
T4 vs. T6	—	37 (b)	37 (b)
T3 vs. T4	—	—	147 (c)
T3 vs. T5	—	—	160 (c)

Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

La isolinea nodulada podría, según Ruschel y otros (1979), tomar más nitrógeno del suelo que la no nodulante debido a un efecto sinérgico del nitrógeno fijado.

Con respecto al cálculo por diferencia de valores "A", los resultados, considerando nivel 1 para la planta fijadora y nivel 2 para la planta no fijadora, son prácticamente iguales a los obtenidos mediante el otro método de cálculo. Ello no ocurre cuando se invierten los tratamientos a considerar, porque deja de gravitar el N₂ fijado (tercera fuente de nitrógeno), ya que la alta dosis de fertilización redujo apreciablemente la formación de nódulos y por lo tanto hubo una reducción en la fijación de N₂.

Otro hecho importante para destacar es que en los tratamientos de soja sin inocular (T1 y T4) no se observó ninguna nodulación, debiendo recordarse que el ensayo estuvo ubicado en terreno donde nunca se había sembrado soja ni ninguna otra leguminosa.

La Tabla 4 pone de manifiesto que el nivel 2 de nitrógeno actuó disminuyendo la nodulación a tal punto en el tratamiento T6, que el recuento y peso de los nódulos muestra que hay sólo un 17 por ciento de la nodulación observada en el nivel 1 (T3). Este hecho ha influido en el comportamiento de la leguminosa con respecto a la fijación de N₂; así en la Tabla 5 es posible observar que en el nivel 1, el cultivo fijador (T3) contiene proporcionalmente un 40 por ciento menos de nitrógeno proveniente del fertilizante y un 30 por ciento menos del proveniente del suelo en relación a los controles (T1 y T2); en cambio en el nivel 2 como la fijación ha disminuido, la composición del cultivo fijador (T6) y los controles (T4 y T5) es muy semejante. En la Tabla 6 los valores son en kgN/ha y se aprecia una diferencia de 41 kgN/ha (en el N total) a favor de la soja inoculada a nivel 1 (T3) con respecto a T6.

Aunque Ruschel y col. (1979) no citan cifras individuales, señalan "gran variabilidad" entre repeticiones, lo que no ha ocurrido en el presente ensayo.

Los promedios del nitrógeno fijado oscilan entre 149 y 97 kg/ha y se asemejan a los valores encontrados por otros autores que figuran en la literatura internacional (Ham et al., 1978; Weber, 1966): 80 kg N/ha y 84 kg N/ha usando en ambos casos para medir el N₂ fijado, el método de diferencia de contenido de nitrógeno entre isolíneas nodulantes y no nodulantes.

Utilizando técnicas isotópicas, Ham (1978) obtuvo valores que oscilan entre 155 y 180 kg N/ha y Eaglesham et al. (1982) citan 125,2 kg N/ha, fijación determinada por aplicación del valor "A".

Todos los valores anteriormente citados corresponden a dosis de fertilizante marcado iguales o similares a la utilizada por los autores para el nivel 1.

La Tabla 3, muestra los datos de fijación calculados mediante el método de la diferencia de contenido

TABLA 4: Observaciones de nódulos en tres edades del cultivo. Valores promedio correspondientes a seis plantas por repetición.

Tratamiento	Antes de floración		Principios de floración			Vaina llena		
	Número de nódulos		Número de nódulos		Peso seco (g)	Número de nódulos		Peso seco (g)
	Raíces primarias	Raíces secundarias	Raíces primarias	Raíces secundarias		Raíces primarias	Raíces secundarias	
T3	8	11	28	23	0,706	109	253	4,09
T6	1	0	4	4	0,060	13	47	0,72

TABLA 5: Valores porcentuales de N según su origen. Promedio de 6 repeticiones.

	N del Fert.	N del Suelo	N fijado
T1	4,85	95,15	-
T2	6,15	93,85	-
T3	3,37	68,39	28,24
T4	26,83	73,17	-
T5	28,75	71,25	-
T6	23,55	63,57	12,87

TABLA 6: Valores absolutos de N en kg/ha según su origen.

	N del Fert.	N del Suelo	N fijado	N total
T1	8,78	176,89	-	186
T2	8,24	126,26	-	134
T3	9,48	176,87	98,4	283
T4	61,38	168,95	-	230
T5	56,00	141,66	-	198
T6	57,13	144,32	37,00	242

de nitrógeno para el experimento realizado por los autores, los cuales en el nivel 1 de fertilización son prácticamente iguales a los obtenidos por el método isotópico.

CONCLUSIONES

- 1) La soja no inoculada (Williams) y el sorgo granífero (NK 308) resultaron aptos para actuar como cultivos controles para medir la fijación de nitrógeno por parte de la soja inoculada (Williams) con el método isotópico.
- 2) La dosis de 20 kg N/ha resultó la más adecuada para la aplicación de la metodología.
- 3) La aplicación de la fórmula de Fried et al. permitió obtener datos de fijación que concuerdan tanto con otros citados en la bibliografía internacional, como con los obtenidos por el método de diferencia, en el presente experimento.
- 4) La fijación normal de N_2 produjo un aumento de los rendimientos en grano. Cuando aquella se vió reducida por la dosis alta de fertilización, los rendimientos no mostraron diferencia entre soja inoculada y no inoculada.

REFERENCIAS

- Bremner, J. M., 1965. Isotope-Ratio Analysis of Nitrogen in Nitrogen-15 Tracer Investigations. En: Black, C.A (editor). Methods of Soil analysis. Part. II. American Society of Agronomy, Inc. Publisher. Madison, Wisconsin. U.S.A. 1256-1283.
- Eaglesham, A. R. J.; A. Ayanaba; V. Ranga Rao and D. L. Eskew, 1982. Mineral N effects on cowpea and soybean crops in a Nigerian soil. Plant and Soil 68, 183-192.
- Fried, M.; H. Broeshart, 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 43, 707-711.
- Fried, M.; V. Middelboe, 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 47, 713-715.

- Ham, G. E.; I. E. Liner, S. D. Evans and W. W. Nelson, 1975. Yield and composition of soybean seed as affected by N and S fertilization. *Agron. J.* 67, 292-297.
- Ham, G. E., 1978. Use of ¹⁵N in evaluating symbiotic N₂ fixation of field-grown soybeans. I.A.E.A. (editor). *Isotopes in Biological Dinitrogen fixation*. I A.E.A. Viena 151-163.
- Pimentel Gomes, F., 1977. *Iniciación a la estadística experimental*. Cap. 10. 161-178. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 211 p.
- Ruschel, A. P.; P. B. Vose; R. L. Victoria and E. Salati, 1979. Comparison of isotope techniques and nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in Soybean, *Glycine Max*. *Plant and Soil* 53, 513-525.
- Weber, C. R.; 1966. Nodulating and non-nodulating soybean isolines: II. Response to applied nitrogen and modified soil conditions. *Agron. J.* 58, 46-49.