



Centro Internacional de Agricultura Tropical
Desde 1967 *Ciencia para cultivar el cambio*



Manual de Protocolos Nutrición y Fisiología de Plantas

Forrajes y Frijol

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) —un Centro de Investigación de CGIAR— desarrolla tecnologías, métodos innovadores y nuevos conocimientos que contribuyen a que los agricultores, en especial los de escasos recursos, logren una agricultura eco-eficiente; es decir, competitiva y rentable así como sostenible y resiliente. Con su sede principal cerca de Cali, Colombia, el CIAT realiza investigación orientada al desarrollo en las regiones tropicales de América Latina, África y Asia.

www.ciat.cgiar.org

CGIAR es una alianza mundial de investigación para un futuro sin hambre. Su labor científica la llevan a cabo 15 Centros de Investigación en estrecha colaboración con cientos de organizaciones socias en todo el planeta.

www.cgiar.org

ISBN impreso: 978958694170-9

ISBN digital: 978958694169-3

Manual de Protocolos

Nutrición y Fisiología de Plantas

Forrajes y Fríjol

Área de Investigación en Agrobiodiversidad



Centro Internacional de Agricultura Tropical
Desde 1967 *Ciencia para cultivar el cambio*

Centro Internacional de Agricultura Tropical
Apartado Aéreo 6713
Km 17 Recta Cali-Palmira CP 763537
Cali, Colombia
Teléfono: 57 2 4450000
Fax: 57 2 4450073
Correo electrónico: ciat@cgiar.org
Sitio web: www.ciat.cgiar.org

Impreso en Colombia
Noviembre 2017

Borrero Tamayo GA; Jiménez J; Ricaurte JJ; Rivera M; Polanía JA; Núñez J; Barbosa N; Arango J; Cardoso JA; Rao IM. 2017. Manual de protocolos. Nutrición y fisiología de plantas - Forrajes y frijol. Área de Investigación en Agrobiodiversidad, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 186 p.

ISBN impreso: 978958694170-9
ISBN digital: 978958694169-3

Derechos de autor © CIAT 2017. Todos los derechos reservados.

El CIAT propicia la amplia disseminación de sus publicaciones impresas y electrónicas para que el público obtenga de ellas el máximo beneficio. Por tanto, en la mayoría de los casos, los colegas que trabajan en investigación y desarrollo no deben sentirse limitados en el uso de los materiales del CIAT para fines no comerciales. Sin embargo, el Centro prohíbe la modificación de estos materiales y espera recibir los créditos merecidos por ellos. Aunque el CIAT elabora sus publicaciones con sumo cuidado, no garantiza que sean exactas ni que contengan toda la información.

Contenido

Prefacio.....	1
Historial de las investigaciones en suelos y nutrición. Fisiología de plantas.....	2
Capítulo 1	
Análisis de suelos y tejido vegetal. Técnicas de muestreo	4
Análisis de suelos	4
Introducción	4
Instrucciones para tomar una muestra de suelo.....	5
Preparación de muestras de suelo	6
Incertidumbre y precisión en los análisis de suelo.....	7
Análisis de tejido vegetal	7
Introducción	7
Instrucciones generales para tomar una muestra de plantas.....	8
Preparación de muestras de plantas	8
Listado de mediciones, determinaciones y metodologías.....	8
Capítulo 2	
Protocolos de análisis en tejido vegetal.....	10
Importancia del fósforo (P).....	10
Determinación de fósforo total (Pt) en tejido -	
Método de digestión ácida (nítrico-perclórico)	12
Determinación de P y N totales en tejido vegetal -	
Método de digestión ácida ($H_2SO_4 + Se$).....	17
Determinación de materia seca	22
Determinación de carbohidratos totales no estructurales (CTNE) en materiales de plantas.....	24
Determinación de cenizas en tejido vegetal - Método gravimétrico	29

Capítulo 3

Protocolos de análisis en suelo.....	31
Determinación de pH en suelos	31
Determinación de conductividad eléctrica (CE)	34
Determinación de fósforo (P) en suelo - Método Bray II (P disponible en suelos ácidos)	40
Determinación de fósforo total (Pt) en suelos -	
Método digestión ácida (nítrico-perclórico)	44
Protocolo de muestreo de suelos para determinación de carbono.....	48
Determinación de carbono en suelos (Walkley & Black)	54
Determinación de carbono en suelos (Walkley & Black) con calentamiento	60
Determinación de aluminio (Al) (acidez intercambiable)	65
Determinación de % humedad en suelo	69
Protocolo de incubación de suelo para nitritos, nitratos y amonio	72
Determinación de nitrito (NO ₂ ⁻) en suelo.....	76
Determinación de nitrato (NO ₃ ⁻) en suelo.....	80
Determinación de amonio (NH ₄ ⁺) en suelo.....	85
Fraccionamiento secuencial de fósforo	89
Metodología para la evaluación de la compactación de suelo.....	101

Capítulo 4

Protocolos para mediciones fisiológicas en material vegetal de frijol.....	109
Protocolo para evaluación fenotípica bajo estrés por sequía.....	109
Evaluación en campo de atributos aéreos y de raíces	109
Atributos de la planta para evaluar la adaptación a sequía.....	119
Evaluación en invernadero para el desarrollo de raíces.....	120
Fenotipaje de frijol para la fijación simbiótica de nitrógeno (SNF).....	126
Protocolo para la evaluación en campo.....	126
Fijación simbiótica de nitrógeno (SNF).....	126
Diseño de campo.....	127
Muestreo en el momento de la floración.....	127
Muestreo a mitad de llenado de vaina	132
Muestreo en época de cosecha.....	133
Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno.....	135

Capítulo 5

Protocolos adaptados para mediciones en material vegetal

(Forrajes y Fríjol)	138
Metodología para evaluar genotipos del género <i>Brachiaria</i> en soluciones nutritivas con alto aluminio.....	138
Diferencias fenotípicas en desarrollo de pelos de raíces entre genotipos de frijol común	147
Metodología para evaluar genotipos de frijol en soluciones nutritivas con alto aluminio	150
Determinación de proteína (método Bradford)	158
Determinación de la actividad de la catalasa.....	161
Determinación de la actividad antioxidante por DPPH.....	165
Determinación de la actividad antioxidante por ABTS.....	168
Determinación del potencial IBN a través del bioensayo.....	172
Cuantificación de microorganismos por métodos moleculares.....	177

Capítulo 6

Políticas institucionales sobre riesgo químico y manejo de información..... 181

Gestión del riesgo químico	181
Sistema de manejo de información.....	183

Información de los autores.....	185
---------------------------------	-----

Agradecimientos	186
-----------------------	-----



Prefacio

Los datos de campo y laboratorio son una valiosa herramienta para el entendimiento de los procesos relacionados con la dinámica del suelo y de las plantas en respuesta a los factores de manejo y de índole ambiental.

Con esto en mente, los objetivos de este manual son: (1) servir como una referencia estándar en la descripción de las técnicas analíticas y de investigación en suelos y en los cultivos asociados que realiza el Laboratorio de Nutrición y Fisiología, al igual que metodologías de campo e invernadero utilizadas en los proyectos de los Programas de Fríjol y Forrajes; (2) registrar las técnicas existentes y actualizar las técnicas implementadas; y (3) proveer descripciones detalladas de los métodos para la recolección de muestras de suelo, tejido, componentes de plantas y/o gases.

Este documento describe en seis capítulos las diferentes técnicas, metodologías desarrolladas y/o adaptadas, aplicadas a la investigación tanto a nivel de laboratorio como en campo e invernadero. El Capítulo 1 está relacionado con las técnicas de muestreo en suelo y tejido vegetal y sus generalidades. El Capítulo 2 describe las determinaciones químicas y físicas realizadas a muestras de tejido vegetal. El Capítulo 3 explica las determinaciones químicas y físicas realizadas a muestras de suelo. El Capítulo 4 pormenoriza las metodologías para evaluación de genotipos de fríjol a estrés por sequía, fijación biológica de nitrógeno, compactación de suelo y longitud de pelos de raíces en campo y/o invernadero. El Capítulo 5 ilustra las metodologías adaptadas para

mediciones en plantas forrajeras que involucran tolerancia a altas concentraciones de aluminio, la determinación de proteínas y la actividad de catalasa, el antioxidante DPPH y ABTS, la inhibición biológica de la nitrificación (IBN) y la identificación de microorganismos mediante técnicas moleculares. Por último, en el Capítulo 6, se hace referencia al programa de gestión de riesgo químico, las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y al sistema de manejo de información. Todos estos implementados en CIAT como parte de las políticas institucionales.

En la redacción del presente manual, intervinieron los distintos grupos técnicos responsables de cada una de las áreas aquí presentadas, pertenecientes a los Programas de Forrajes y Fríjol del CIAT. Sin embargo, algunas de las técnicas actualmente estandarizadas fueron posibles —incluso varias— gracias a los esfuerzos pioneros realizados desde la década de 1960. Por esta razón, a todos ellos, en conjunto, debemos esta edición del Manual de Protocolos. Nutrición y Fisiología de Plantas (Forrajes y Fríjol).

Hago mención especial a los asistentes y asociados: José Jaumer Ricaurte, José A. Polanía, Mariela Rivera, Norma Barbosa, Juan de la Cruz Jiménez, Jonathan Núñez, por sus valiosos aportes en la elaboración de los protocolos. A los doctores Jacobo Arango y Juan Andrés Cardoso, por su diligencia y dirección. Al Dr. Idupulapati Rao, por sus años de labor invaluable dedicados a la investigación y aportes significativos al CIAT.

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

Bioquímico MSc Suelos
Asociado de Investigación

Historial de las investigaciones en suelos y nutrición

Fisiología de plantas

Las primeras investigaciones en suelos y nutrición de plantas en los trópicos fueron realizadas por el Dr. Jim Spain en la década de los sesenta. Su objetivo era superar las limitaciones edáficas y mejorar la producción agrícola y ganadera en estas zonas.

Durante los años setenta y ochenta, varios investigadores; entre ellos, el mencionado Dr. Spain, Pedro Sánchez, José Salinas, Walter Couto, José Sanz, Miguel Ayarza y Alfredo León —este último, en el Centro Internacional de Desarrollo de Fertilizantes (IFDC por sus siglas en inglés)— realizaron estudios en pastos tropicales. Con respecto al frijol, los primeros estudios estarían a cargo de Michael Thung, Jonathan Lynch y Reinhardt Howeler. Todos ellos realizaron contribuciones a la ciencia del suelo y a la nutrición de las plantas para el mejoramiento de la productividad agrícola y ganadera en el trópico.

A su vez, a inicios de la década de los ochenta, Reinhardt Howeler y Dietrich Leihner comenzaron a realizar investigaciones sobre la conservación de suelos en campos de yuca en agrosistemas de ladera. En los años noventa, Karl-Muler Samann y Edgar Amézquita (en Colombia) y Reinhardt Howeler (en Asia) continuaron esta línea de pesquisa. Mientras tanto, Peter Graham, Judy Kipe-Nolt, Douglas Beck (en frijol) y Rosemary Bradley (en pastos tropicales) realizaban contribuciones valiosas para el mejoramiento de la fijación de nitrógeno en las leguminosas. Asimismo, Ewald Sieverding, Reinhardt Howeler y Saif R. investigaban sobre las simbiosis de micorrizas en yuca y pastos tropicales.

Unos años atrás (septiembre de 1979), el Laboratorio de Nutrición y Fisiología de Plantas (LNFP), daba inicio a sus labores bajo la supervisión de José Salinas y la asistencia de Ramiro García. Allí, se realizaban análisis de forrajes y suelos. Incluso, aún se conserva el manual mecanografiado de los métodos químicos para el análisis de los suelos ácidos y plantas forrajeras (CIAT, octubre 1985).

Posteriormente, Ramón Gualdrón asumió de forma temporal la supervisión del laboratorio hasta la llegada del Dr. Idupulapati Rao en 1989 (quien trabajaría con

forrajes y frijol); entretanto, se vincularían asistentes como Ramiro García, Vicente Borrero (1987-1990) y Jaumer Ricaurte (1990). En los Llanos Orientales colombianos, se contaría con la colaboración de Pedro Herrera, Juan Carlos Granobles, Carlos Guillermo Meléndez (1996-1967), Irlanda Isabel Corrales, Camilo Plazas y Daniel Vergara.

A finales de los años ochenta, el programa de Pastos Tropicales creó la unidad de investigación en mejoramiento de pastos con un equipo de científicos (Myles Fisher, Miguel Ayarza, Richard Thomas, Idupulapati Rao, Carlos Lascano y Georges Rippstein), quienes estudiaron la relación suelo-planta-animal con el fin de mejorar el reciclaje de nutrientes. A inicios de los años noventa, el programa se dividió en dos: Pastos Tropicales (conformado por Idupulapati Rao, Carlos Lascano y liderados por Peter Kerridge); y Sabanas (integrado por Myles Fisher, Richard Thomas, Miguel Ayarza, Georges Rippstein y liderados por Raúl Vera) como parte del plan estratégico del CIAT.

De igual modo, en la década de los noventa, la investigación de suelos se enfocó en las sabanas, que más tarde se denominó trópico bajo. Un equipo conformado por Richard Thomas, Myles Fisher, Dennis Friesen, José Sanz, Edgar Amézquita, Miguel Ayarza, Arjian Gijsman y Astrid Oberson realizaron progresos destacados en el área del entendimiento de los procesos físicos, químicos y biológicos en sistemas agropastoriles de esta sabana tropical.

En el año de 1993, se creó el Laboratorio de Química de Suelos bajo la asistencia de Gonzalo Antonio Borrero Tamayo, y supervisión de Astrid Oberson —investigadora asociada del Instituto de Suelos y Plantas de Eschikon, Suiza (Convenio ETH-Zurich, Suiza). Su principal función fue realizar análisis químicos cuantitativos en los procesos involucrados en el reciclaje de nutrientes, especialmente con el fósforo (P). Otras actividades incluían llevar a cabo pruebas y la estandarización de metodologías de análisis en los diferentes tipos de suelos trabajados, en particular, en el fraccionamiento de fósforo (P);

P microbial, la absorción de P y comparaciones entre diversas metodologías tradicionales con nuevos métodos de laboratorio, como el montaje de un laboratorio de radioisótopos (^{32}P , ^{33}P) para la realización de análisis químicos y bioquímicos de las plantas.

En 1996, Richard Thomas asumió el liderazgo de lo que se llamarían proyectos (no programas) y que dio origen al proyecto PE-2, cuyo enfoque sería: identificar principios estratégicos; las metodologías para proteger y mejorar la calidad del suelo; llevar a cabo un uso más eficiente y sustentable del suelo, las aguas y los nutrientes en agrosistemas de sabana tropical y laderas. Además de los científicos mencionados, se integraron a este grupo: Edmundo Barrios, Juan Jiménez y Marco Rondón.

En 2001, el grupo ganaría el premio *CGIAR Excellence in Science Award for Outstanding Partnership* (Premio de CGIAR por Excelencia en la Ciencia por Alianza Sobresaliente), por su trabajo en manejo sostenible en suelos ácidos de sabana. En ese mismo año, se daría inicio al trabajo del Instituto de Biología y Fertilidad de Suelos del CIAT (TSBF-CIAT por sus siglas en inglés), cuyo enfoque principal sería aliviar la pobreza y realizar un manejo sostenible del agua, tierras y recursos forestales. Luego, se haría énfasis en el manejo de la fertilidad del suelo y se combinarían trabajos, tanto de química como de biología del suelo, bajo la asistencia de Neuzo Asakawa.

Dos años después, en 2003, ingresó al grupo José Arnulfo Polanía para llevar a cabo investigaciones en el tema de sequía; Joisse Dayana Rincón en inundación; Mariela Rivera en el Laboratorio de Física de Suelos, dando continuidad a las labores iniciadas por el Dr. Edgar Amézquita y la asistencia de Jesús Hernando Galvis Quintero. En 2008, Aracely Castro entró a ser parte del equipo —en especial, en el campo de los suelos— hasta su retiro en 2014.

De igual forma, al retirarse (por jubilación) Ramiro García en octubre del 2009, Gonzalo Borrero asume las funciones de este en el Laboratorio de Nutrición y Fisiología de Plantas (fríjol y forrajes); cuyo jefe inmediato sería el Dr. Idupulapati Rao. A partir de esta fecha, se realizarían modificaciones en las

metodologías para la optimización de los insumos al contarse con equipos de vanguardia en análisis como los de placas multilectoras (Equipo *Synergy* UV-VIS de marca *Biotek*).

En el año 2008, bajo la supervisión de Juan Andrés Cardoso y la coordinación de Juan de la Cruz Jiménez (2012), se dió inicio a la identificación de los atributos fisiológicos asociados con la tolerancia a estrés abiótico en *Brachiaria* spp. y a la selección de sus híbridos con adaptación sobresaliente al mencionado estrés.

En enero de 2009, Mariela Rivera asumió, en calidad de investigadora asociada en el área de fríjol, el trabajo relacionado con la selección de genotipos tolerantes a la compactación del suelo en interacción con los estreses abióticos: sequía, calor y baja fertilidad. En 2011, Danilo Moreta iniciaría sus labores con el proyecto de inhibición biológica de la nitrificación (IBN) a nivel de campo (lote CIAT) y laboratorio. En este último para realizar determinaciones de nitrato, nitrato y amonio, junto con análisis de laboratorio moleculares a través de PCR (reacción en cadena de polimerasa) y PCR en tiempo real (qPCR).

Este fenómeno de IBN en *Brachiaria humidicola* se ha ejecutado como una estrategia novedosa para mejorar la ecoeficiencia de los sistemas de producción agropecuarios y para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Este proyecto ha sido liderado por el Dr. Jacobo Arango —desde agosto de 2012— y ha contado con la participación de estudiantes de varias universidades.

Paralelo a este ensayo, se llevan a cabo muestreos de gases para determinar óxido nitroso y metano en el Laboratorio de Servicios Ambientales, por medio del cromatógrafo de gases GC/FID/ECD, a cargo de Sandra Patricia Loaiza y Carolina Quintero. En octubre de 2013, se continúa con la evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno en fríjol común, a través de fenotipaje y 15 N, realizada por Norma Barbosa.

En la actualidad, Juan de la Cruz Jiménez y José Polanía trabajan en la implementación de nuevas técnicas, como la determinación de la prolina.

A medida que se estandaricen nuevos protocolos, se irán incluyendo en el manual.



Capítulo 1

Análisis de suelos y tejido vegetal

Técnicas de muestreo

Análisis de suelos

Introducción

El análisis químico del suelo constituye una de las técnicas más utilizadas para la recomendación de fertilizantes. Es una fuente de información vital para el manejo de suelos, la cual permite:

- Clasificar los suelos en grupos afines
- Predecir las probabilidades de obtener respuesta positiva a la aplicación de elementos nutritivos
- Ayudar en la evaluación de la fertilidad del suelo
- Determinar las condiciones específicas del suelo que pueden ser mejoradas

Así, la información obtenida mediante los análisis de suelos es una buena base para hacer las recomendaciones sobre fertilización para situaciones específicas.

Se ha demostrado que dichos análisis constituyen una excelente guía para el uso racional de los fertilizantes. Sin embargo, no debe olvidarse que en la producción de cultivos interviene un conjunto de factores de gran importancia como el clima, las variedades, el control fitosanitario, el manejo general y otras, que podrían limitar el desarrollo adecuado de una planta si no se encuentra en el grado óptimo requerido.

El análisis del suelo es una práctica usual ampliamente aceptada como informativa y parte esencial de cualquier programa de manejo adecuado. Este análisis entrega una estimación de la fertilidad del suelo, ya que solo se analiza una muestra muy pequeña que representa todo el suelo del predio; por ende, el análisis de la fertilidad del suelo debe ser complementado con un análisis de la fertilidad foliar.

La fertilidad de un suelo está relacionada con la disponibilidad de nutrientes minerales para las plantas. Esta depende de un complejo equilibrio de macro y microelementos minerales esenciales para las plantas.

Por otro lado, se debe considerar que la fertilidad del suelo no es constante en el espacio y el tiempo. Por consiguiente, cuando se realiza un análisis de suelo —además de la fertilidad global— otros factores como la profundidad y el momento de muestreo tienen un gran efecto sobre el resultado de la evaluación.

Instrucciones para tomar una muestra de suelo

Para realizar el muestreo de suelo, es necesario establecer criterios para la determinación de “cuánto”, “cuándo”, “dónde” y el “cómo” muestrear dentro de cada predio. Se debe tener en cuenta la representatividad que expondrá la muestra respecto al área de interés y se descartarán sectores que supongan fertilidad excesiva o de extrema pobreza.

El muestreo es el punto más débil en la cadena de análisis de suelos y es la mayor fuente de error. Para obtener resultados confiables, la muestra debe ser representativa del lote muestreado. Solo a partir de esto, podrán obtenerse recomendaciones de fertilización acertadas.

Por ejemplo, la recomendación para la toma de muestra de una hectárea que pese 2600 t, en su capa arable, es 1 kg. Luego, esta será enviada al laboratorio y se extraerá una submuestra de suelo seco para ser cernido con un tamiz de 2 mm de diámetro (según análisis) que, en promedio, pese 100 a 200 g. Por lo tanto, es importante proceder según las instrucciones de muestreo.

¿Cómo obtener una buena muestra de suelo?

Divida en áreas

La superficie a muestrear debe ser homogénea. Defina áreas si existen diferencias en el suelo.

Se recomienda la obtención de una muestra cada 20 ha, compuesta de 15 a 20 submuestras, en un recorrido en zig-zag a lo largo de las diagonales del lote (una cada 50 m de recorrido aproximadamente).

En el caso de sistemas de siembra directa y otros de labranza reducida en los que se realizan aplicaciones

iniciales, fosfóricas fundamentalmente (ubicados en líneas), debe evitar tomar muestras dentro de la línea.

Esto puede dificultarse en los casos que no pueda identificar la ubicación de dicha línea. Cuando así suceda, se recomienda hacer un muestreo “apareado”; esto significa que por cada una de las 15–20 submuestras al azar, debe tomar una segunda submuestra separada de la anterior en un 50% de la distancia entre surcos y de forma perpendicular a la dirección de los mismos. Esta sería una manera apropiada de contrarrestar los valores elevados que obtendría si muestreara en la línea de aplicación de fósforo.

Elija el instrumento y la profundidad de muestreo adecuados

El instrumento de muestreo más aconsejable, por la uniformidad en la profundidad y el tamaño reducido de las submuestras que se obtienen, es el barreno tubular. De no contar con un barreno de este tipo, usted puede obtener una muestra empleando una pala, que debe clavar en forma vertical, a profundidad constante y tomar solo el segmento del medio de la palada. Para la mayoría de las determinaciones químicas, la profundidad más empleada es la de 0–10 o 0–15 cm.

En el caso de realizar diagnóstico de fertilización nitrogenada por medio de la determinación de nitratos —dada la gran movilidad vertical que dicho ion presenta en el suelo— se recomienda tomar muestras a distintas profundidades hasta los 60 cm (0–20 cm, 20–40 cm y 40–60 cm). El muestreo en profundidad de nitratos puede efectuarse con la toma de una muestra por cada profundidad, en una superficie homogénea de 20 ha y conformada por 6 submuestras por estrato.

Momento de muestreo

El muestreo puede llevarse a cabo con bastante antelación a la siembra (45 días por ejemplo) para la mayoría de las determinaciones (pH, materia orgánica, fósforo, etc.); esto permite enviar las muestras al laboratorio, obtener los resultados, dar cuenta del estado de fertilidad del suelo y planificar con mayor tranquilidad las aplicaciones.

Para la determinación de nitratos, la muestra debe ser tomada lo más cercana posible a la época de siembra (10 días antes aproximadamente).

Acondicione e identifique adecuadamente la muestra

Una vez tomadas las correspondientes submuestras, colóquelas en un balde y mezcle hasta homogenizar. Luego, extraiga una muestra final de 400–500 g aproximadamente en bolsas o envases de muestras con su correspondiente identificación.

Coloque la muestra en doble bolsa de plástico. La identificación puede colocarse entre ambas bolsas o en el exterior de esta atada con piola.

En la tarjeta de identificación, se debe especificar: el nombre del sitio de recolección, la fecha, el número de lote, la profundidad, los análisis requeridos y cualquier otra información que considere necesaria.

Para las determinaciones de nitratos, se recomienda que la muestra sea inmediatamente llevada al laboratorio, o de lo contrario deberá preverse el enfriado o secado a temperatura ambiente para frenar la mineralización.

Preparación de muestras de suelo

Secado de las muestras

Las muestras de suelo se secan al aire, extendiéndolas en una capa delgada sobre un papel absorbente, exento de toda clase de contaminación y se deja secar por 72 horas al aire (según la humedad de las muestras). También se pueden secar en un cuarto, estufa u horno de secado manteniéndolas entre 35–40 °C para eliminar los residuos vegetales. Cuando el suelo se procesa en función del peso, es necesario secar la muestra para poder tomar la respectiva alícuota.

Tamizado

Con el fin de homogenizar la muestra, una vez seca, esta se muele con un rodillo de madera y luego se pasa por un tamiz de 2 mm de diámetro. Posteriormente, se empaca en bolsas plásticas o cajas de cartón —previamente identificadas y codificadas— así, queda lista para el análisis de

Precauciones

No tomar submuestras cerca de los alambrados, aguadas, comederos, caminos, cabeceras de lotes; ni cerca de acequias, drenes o sectores inundados (5 a 10 m). Tampoco en la entrada de potreros, de construcciones o galpones, ni en sectores en que se han acumulado residuos vegetales, tales como silos, parvas, etc.

No coleccionar muestras sobre estiércol o manchas de orina. Distanciarse unos 10 m de cercos vivos, árboles, bebederos u otras barreras.

No usar bolsas sucias o que hayan contenido fertilizantes o semillas tratadas con compuestos organofosforados.

Evite muestrear de inmediato luego de una lluvia de más de 20 mm, especialmente para las determinaciones de nitratos.

Limpie bien los elementos de muestreo antes de cambiar de potrero.

No coloque la tarjeta informativa en contacto con el suelo.

laboratorio. Las muestras patrón se deben preparar, de igual forma, para el control de calidad analítico. En seguida que la muestra entra al laboratorio, se le asigna su código respectivo y comienza el proceso para realizar las diferentes determinaciones.

Acondicionamiento y envío de muestra

Las muestras deben ser remitidas y acompañadas de la solicitud de análisis, las que se deberán completar con los datos de quien las envía y la información agronómica correspondiente.

Las bolsitas y/o envases (tubos) de cada una de las muestras (en el caso de nitratos o sulfatos en cajas de icopor y preferiblemente con hielo) se envían a recepción —aunque en el nuevo protocolo se traen y se secan a temperatura ambiente— se muelen e inmediatamente se analizan.

Incertidumbre y precisión en los análisis de suelo

La realización de análisis de suelos es una práctica habitual para el diagnóstico de la fertilización de los cultivos agrícolas, ya que permite cuantificar la oferta de nutrientes del suelo. Si bien existen numerosos artículos con respecto a los diseños muestrales que permiten obtener una muestra de suelo representativa, se ha concluido que el mayor error que se comete en el análisis de suelo corresponde a la toma de muestras en campo.

Desde la extracción de la muestra, hasta que el laboratorio obtiene los resultados analíticos, pueden cometerse un sinnúmero de errores, donde casi un 80% se atribuye a la fase de campo y 20% a la de laboratorio.

Por lo tanto, existen dos errores bien diferenciados:

El error de muestreo que se deriva de la heterogeneidad natural del suelo así como de las prácticas de manejo. Este error es controlable, de forma razonable, a través del incremento del número de submuestras o extracciones que se efectúan por parcela homogénea y mediante el uso de un barreno sacamuestras apropiado. Se debe recordar que, por lo general, una muestra de suelo pesa alrededor de 1 kg; es decir, el 0,00004% del peso medio de la capa superficial de una hectárea, de la cual se pretende que sea representativa.

El error analítico o error de medida del laboratorio, que debemos aceptar, está controlado por la dirección de cada laboratorio.

El error analítico es la discrepancia que existe entre el valor obtenido en el laboratorio y el valor real

de la muestra. Al respecto, un concepto a tener en cuenta es la precisión. Esta se define como una medida del grado de “reproducibilidad” de los resultados para un determinado conjunto de mediciones.

La precisión del análisis de suelo puede ser definida como la dispersión de una serie de valores alrededor de la media, y los parámetros estadísticos que se refieren a este concepto son:

La desviación estándar (s) que indica la dispersión de los valores alrededor de la media en valores absolutos. Se expresa en la misma unidad del resultado.

El coeficiente de variación (CV) que expresa la dispersión en porcentaje y permite comparar la dispersión que tiene dos medidas analíticas que están expresadas en diferentes unidades.

La incertidumbre es un término más globalizador y considera todas las fuentes posibles de error que intervienen en el resultado final. Puede definirse como un parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza el intervalo de valores; estos pueden ser atribuidos razonablemente al valor verdadero.

El concepto de incertidumbre refleja pues la duda acerca de la veracidad del resultado obtenido, una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de error y que se han aplicado las correcciones oportunas. Refleja una idea clara de la calidad del resultado obtenido.

Análisis de tejido vegetal

Introducción

El análisis foliar o de la planta completa representa un análisis cuantitativo de los nutrientes en el tejido vegetal; es un complemento y no un sustituto del análisis de suelo.

La información generada a través del análisis de plantas, junto con los resultados de los análisis de suelos, puede ser una herramienta muy útil en la detección de los problemas nutricionales.

La fase más importante del análisis de plantas es la recolección de la muestra.

Los niveles óptimos de la concentración de los nutrientes varían entre los distintos cultivos, los estados fenológicos de un cultivo (p. ej., plántula, floración, etc.) y las partes de una misma planta (p. ej., tallos, hojas, etc.).

Instrucciones generales para tomar una muestra de plantas

No muestrear plantas muertas afectadas por daños físicos, ni atacadas por insectos o enfermedades.

Evitar muestrear plantas en estado de floración o fructificación avanzados, o con pulverizaciones recientes de insecticidas o fungicidas.

Enjuagar las muestras, suavemente, con agua desionizada para remover las partículas de suelo de la superficie de las hojas. No enjuague demasiado, pues algunos nutrientes solubles podrían perderse.

- Secar las muestras al aire o con un trapo o papel higiénico.
- Para el transporte, colóquelas en bolsas o sobres de papel.
- Nunca transporte las muestras en bolsas de polietileno, ya que podrían pudrirse o descomponerse.
- No es necesario mantener el tejido fresco para el análisis de tejido.

Es muy importante muestrear correctamente e incluir tanta información, como sea posible, acerca del cultivo y el lote.

Para la interpretación de los resultados de los análisis de tejidos vegetales, se utilizará el criterio de suficiencia. Este criterio es el más popular y busca que los valores foliares no sean inferiores a un nivel crítico; es decir, que se ubiquen dentro de un rango de suficiencia.

Análisis que detecten valores en los rangos de *bajo a suficiente* pueden estar asociados con síntomas visiblemente deficientes y/o rendimientos reducidos. Por el contrario, análisis foliares en rango *alto en exceso* se asocian con un derroche en la utilización de fertilización y son potenciales a bajos rendimientos.

Sin embargo, cuando la deficiencia nutricional es observada más temprano, se recomienda tomar plantas en ese momento. En este caso, para realizar una interpretación, deberán muestrearse plantas con apariencia normal y plantas con apariencia anormal; luego, se debe hacer una comparación de los resultados.

Preparación de muestras de plantas



Si las muestras presentan contaminaciones (excremento, polvos, etc.), se deben lavar, brevemente, con agua desionizada y secar al aire.

Luego, secar a 40–60 °C de 24 a 72 horas para evitar pérdidas de nitrógeno (N). Hacerlo lo más pronto posible después de su recolección. Guardarlas en bolsas de papel (evite las bolsas plásticas).

Para análisis diferentes a N, las muestras se pueden secar a 105 °C por 24 horas. Si se dejan por un tiempo, es mejor secar nuevamente por 3 horas a 105 °C.

Molienda: Se muelen las muestras y luego se tamizan (0,7 mm o 1 mm).

Listado de mediciones, determinaciones y metodologías

Nutrición de plantas	
 Suelo	 Planta
pH	Fósforo total (Pt)
Fósforo disponible	Nitrógeno total (Nt)
Fósforo total (Pt)	Carbohidratos totales no estructurales
Carbono	Cenizas
Aluminio (acidez intercambiable)	Materia seca
Nitritos	
Nitratos	
Amonio	
Fraccionamiento secuencial del P	

(continúa)

Relaciones suelo / planta / clima



Suelo

- Densidad aparente
- Contenido de humedad gravimétrica
- Humedad volumétrica
- Resistencia a la penetración



Planta

- Contenido de clorofila en hoja
- Temperatura de follaje
- Eficiencia fotosintética
- Conductancia estomática
- Área foliar
- Longitud total de raíces
- Diámetro promedio de raíces
- Profundización visual de raíces
- Longitud de pelos de raíz
- Habilidad de penetración de raíces
- Evaluación visual de nodulación
- Fijación simbiótica de nitrógeno



Clima

- Precipitación
- Radiación solar
- Humedad relativa
- Evapotranspiración
- Temperatura

Protocolos de metodologías en frijol

- **Metodologías para evaluación fenotípica de estrés por sequía**
Evaluación de campo
- **Metodología para evaluación de adaptación a sequía**
Evaluación de campo
Evaluación en invernadero
- **Metodologías para evaluación de fijación biológica de nitrógeno**
Evaluación de campo
- **Metodologías para evaluación de compactación en invernadero**
Horizontes de suelo compactado en cilindros
Discos de parafina en cilindros
- **Metodologías para evaluación de longitud de pelos de raíces**

Protocolos de metodologías en forrajes

- **Metodologías adaptadas para mediciones en plantas forrajeras**
Soluciones nutritivas con alto aluminio
Proteína
Actividad de catalasa
Actividad antioxidante - DPPH
Actividad antioxidante - ABTS
Inhibición biológica de la nitrificación - IBN
Cuantificación de microorganismos - Método molecular



Capítulo 2

Protocolos de análisis en tejido vegetal

La importancia del fósforo (P)

Introducción

El fósforo (P) es uno de los 17 nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Sus funciones no pueden ser ejecutadas por ningún otro nutriente y se requiere un adecuado suplemento de P para que la planta crezca y se reproduzca en forma óptima.

El P se clasifica como un nutriente primario, razón por la cual es comúnmente deficiente en la producción agrícola y los cultivos lo requieren en cantidades relativamente grandes. La concentración total de P en los cultivos varía de 0,1 a 0,5%, pero en algunos cultivos llega hasta el 1%.

Durante la absorción y transporte del P, este penetra en la planta a través de las capas externas de las células de los pelos radiculares y de la punta de la raíz. A su vez, la absorción también se produce a través de las micorrizas, que son hongos que crecen en asociación con las raíces en muchos cultivos.

El P es absorbido por la planta, principalmente, como ion ortofosfato primario (H_2PO_4^-); pero también, se absorbe como ion fosfato secundario (HPO_4^{2-}), la absorción de esta última forma se incrementa a medida que se sube el pH.

Una vez dentro de la raíz, el P puede quedarse almacenado en esta área o puede ser transportado a las partes superiores de la planta.

A través de varias reacciones químicas, el P se incorpora a compuestos orgánicos como ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfoproteínas, fosfolípidos, enzimas y compuestos fosfatados ricos en energía como el adenosín trifosfato (ATF).

El P se mueve en la planta en forma de iones ortofosfato y como P incorporado en los compuestos orgánicos formados. Así, el P se mueve

a otras partes de la planta donde estará disponible para más reacciones.

El P juega un papel vital en prácticamente todos los procesos que requieren transferencia de energía en la planta. Los fosfatos de alta energía, que son parte de la estructura química del adenosín difosfato (ADF) y del adenosín trifosfato (ATF), son la fuente de energía que impulsa la generación de reacciones químicas dentro de la planta.

La transferencia de los fosfatos de alta energía del ADF y ATF a otras moléculas (proceso denominado fosforilación) desencadena una gran cantidad de procesos esenciales para la planta.

Dentro de las reacciones químicas que ocurren en la naturaleza, la fotosíntesis es la más importante. Esta reacción utiliza energía luminosa, en presencia de clorofila, para combinar el dióxido de carbono y el agua en azúcares simples. En este proceso, la energía solar es capturada en el ATF e inmediatamente este compuesto está disponible como fuente de energía para muchas otras reacciones dentro de la planta. Por otro lado, los azúcares formados se usan como bloques para construir otras células estructurales y compuestos para almacenamiento.

Mientras ocurre la transferencia genética, el P es un componente vital de las sustancias que forman los genes y cromosomas. De este modo, es parte esencial de los procesos que transfieren el código genético de una generación a la siguiente; provee el mapa genético para todos los aspectos de crecimiento y reproducción de la planta.

El suplemento adecuado de P es esencial para el desarrollo de nuevas células y para la transferencia del código genético de una célula a otra, a medida que se desarrollan nuevas células.

En las semillas y en el fruto se acumulan grandes cantidades de P, elemento esencial para la formación y desarrollo de dichas estructuras. Asimismo, el P es parte de la fitina: la forma principal de almacenamiento de P en la semilla.

Alrededor del 50% del P total en las semillas de las leguminosas y del 60 al 70% en los cereales se almacena como fitina o compuestos similares. Un suplemento deficiente de P puede reducir el tamaño, número y viabilidad de las semillas.

En el proceso de transporte de nutrientes, las células de las plantas pueden acumularlos en concentraciones mayores de las presentes en la solución del suelo que les rodea. Esta condición permite a las raíces extraerlos de la solución del suelo donde se encuentran en concentraciones muy bajas.

El P es el segundo nutriente más limitante después del nitrógeno (N); sin embargo, puede llegar a ser el más limitante, en especial, en suelos ácidos donde las formas de P disponibles para la planta, se ven disminuidos (Vitousek y Sanford, 1986).

El movimiento de nutrientes dentro de la planta depende mucho del transporte a través de las membranas de las células, proceso que requiere de energía para contrarrestar las fuerzas de osmosis. De nuevo aquí, el ATF y otros compuestos fosforados proveen la energía necesaria para el proceso.

Debido a que el P es fácilmente movilizado en la planta, cuando ocurren las deficiencias de este nutriente, el P se transloca de los tejidos viejos a tejidos meristemáticos activos y, por esta razón, los síntomas aparecen en las hojas viejas (parte baja) de la planta. Sin embargo, estos síntomas de deficiencia rara vez se observan en el campo y se evidencia, en general, por una pérdida apreciable de rendimiento.

La deficiencia de P en la planta se observa en el retraso de la madurez, en la mala calidad de los forrajes, frutas, hortalizas y granos; así como en una reducción de la resistencia de las plantas a las enfermedades.

Uno de los primeros síntomas de la deficiencia de P es la inhibición específica de la expansión y el área superficial de la hoja (Rao, 1996).

Determinación de fósforo total (Pt) en tejido

Método de digestión ácida (nitríco-perclórico)

Principio

Para analizar los elementos presentes en el tejido (en este caso para P Total), hay que destruir la materia orgánica (MO) por medio de una digestión ácida o una calcinación.

Esta determinación se basa en la digestión de las muestras de tejido de la planta en presencia de una mezcla ácida: ácido nítrico y perclórico en un bloque de digestión para tubos Taylor, durante 60 min a una temperatura de 200 °C.

El P se convierte, por medio de oxidación, en la forma de fosfato que se puede leer por colorimetría. Se utiliza el método de azul de molibdeno (Murphy and Riley, 1962), el cual produce un complejo fosfomolibdico en solución ácida que, a su vez, es reducido por el ácido ascórbico para formar la coloración azul.

Equipo

- Digestor de bloque tubos Taylor 50 ml
- Agitador de tubos
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Ácido nítrico (HNO₃) 65%
- Ácido perclórico (HClO₄) 70–72%
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄) 99,3%
- Agua bidestilada y desionizada

Preparación de soluciones

Mezcla nítrico-perclórico

Se prepara en relación 2:1 (p. ej., 2 litros de HNO₃ y 1 litro de HClO₄).

Se realizan los cálculos según la cantidad de mezcla requerida; así, para 1 litro de mezcla, serían 667 ml de HNO₃ y 333 ml de HClO₄.

Reactivo color para P

Se preparan 2 soluciones para desarrollo de color.

Solución A

60 g de heptamolibdato de amonio ((NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O) en 200 ml de agua bidestilada.

1,455 g de tartrato de antimonio y potasio (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂·3H₂O) y disuelva en mezcla anterior.

Agregue lentamente con agitación suave 700 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) y deje enfriar para completar a volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Solución B

132 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) y complete a volumen de 1 l (agua bidestilada).

Solución color

25 ml de solución A

10 ml de solución B

Completar a volumen de 1 litro (agua bidestilada). Preparar solución, cada vez que se vaya a leer.

Solución patrón de P: 50 μg P/ml (50 ppm)

Seque unos gramos de KH_2PO_4 en el horno por 1 hora, a 105 °C y luego colóquelos en un desecador.

PM KH_2PO_4 = 136,09 g/mol P = 30,97 g

Opción 1: preparar una solución de 1000 ppm P y de ahí preparar la de 50 ppm P.

$(136,090 \text{ mg } \text{KH}_2\text{PO}_4 / 30,970 \text{ mg P}) * (1000 \text{ mg} / 1\text{g}) = 4,39425 \text{ mg } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 4,39425 \text{ g } \text{KH}_2\text{PO}_4$

Para 1 litro de solución 1000 ppm $\rightarrow 4,39425 \text{ g } \text{KH}_2\text{PO}_4$

Pero como la pureza del reactivo es del 99,3% $\rightarrow 4,4252 \text{ g } \text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{litro}$

Nota: se puede preparar menos volumen si no se requiere 1 litro.

Aplicando la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$

$V_1 (1000 \text{ ppm}) = (100 \text{ ml}) (50 \text{ ppm})$

$V_1 = 5 \text{ ml}$

Entonces, tome 5 ml de la solución de 1000 ppm y complételo a 100 ml con agua bidestilada; así, obtiene una solución de 50 ppm P.

Opción 2: preparación directa de solución de 50 ppm P

$(136,09 \text{ g} / 30,97 \text{ g}) * 5 \times 10^{-2} \text{ mg} = 0,2197 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Para 1 litro sería: $0,2197 \text{ mg/ml} * 1000 \text{ ml} = 219,7 \text{ mg} = 0,2197 \text{ g de } \text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{litro}$

Como el % de pureza es del 99,3% $\rightarrow 0,2212 \text{ g}$

Pese 0,2212 g del reactivo seco y disuélvalo en agua. Luego complete a volumen de 1 litro con agua bidestilada. De esta manera obtendrá 1 litro de solución de 50 ppm de P.

Cálculo para preparación de la curva

Preparada a partir de la solución patrón de 50 μg P/ml (50 ppm)

Aplicando la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$

balones de 100 ml

$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (0,2 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 0,4 \text{ ml}$

$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (0,5 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 1 \text{ ml}$

$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (1,0 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 2 \text{ ml}$

V_1 (50 ppm) = 100 ml (10 ppm) → $V_1 = 20$ ml

Y así sucesivamente con todos los puntos de la curva. Completar en balones de 100 (o 50 ml) con agua bidestilada.

Tabla resumen

ppm P	Balones de 100 ml	Balones de 50 ml
ml de solución 50 ppm a tomar		
0	0	0
0,2	0,4	0,2
0,5	1	0,5
1	2	1
2	4	2
4	8	4
6	12	6
8	16	8
10	20	10

① → ② → ③ → Procedimiento

1. Pesar 0,1 g de muestra (tejido vegetal) en tubos Taylor graduados a 50 ml. Adicionar 5 ml de mezcla nítrico-perclórico (2:1) y colocarlos en el bloque de digestión (usar cámara para este tipo de ácidos y con la protección requerida) durante 60 min a 200 °C. Incluir patrones control y duplicar, al menos, una muestra por tanda (en este caso, se duplica la última).
2. Dejar reposar y completar a volumen de 50 ml con agua desionizada. Agitar muy bien antes de lectura.
3. En tubos de vidrio de menor volumen, tomar 0,5 ml de alícuota y posteriormente adicionar 4,5 ml de reactivo color. Igual tratamiento reciben los puntos de la curva, cuyos patrones deben conservarse refrigerados; solo se sacan y se dejan reposar antes de realizar la lectura (0,5 ml de curva y 4,5 ml de reactivo color). Al blanco no se le hace lo anteriormente mencionado, pues a este se le duplican o triplican los volúmenes para ajustar el punto cero de la curva.
4. Agitar muy bien (Vortex) las muestras, dejar mínimo 15 minutos para que se desarrolle el color completamente y proceder a realizar las lecturas en el espectrofotómetro (Gilford o Synergy [250 μl]) a una longitud de onda de 660 nm. Leer las muestras el mismo día en que se colorean y después de pasados 15 min.



Resultados

A los resultados de absorbancia (ABS) obtenidos, se les aplica la siguiente ecuación. De este modo, obtendremos los mg P/g de suelo y luego se calcula el porcentaje:

$$Y = AX+B$$

Donde Y es la concentración buscada

$$X = \text{ABS}$$

A = constante dada por la ecuación y que representa la pendiente

B = constante dada por la ecuación y que representa el intercepto

Entonces $Y = \text{ABS}(A)+B$ aquí hallamos los $\mu\text{g/ml}$ que hay en la solución

Como se pesó 0,1 g y se llevó a $V= 50 \text{ ml}$

$\mu\text{g/ml} * 50/0,1 = \mu\text{g/g}$ aquí tenemos la cantidad de P/g de tejido (o ppm)

Para dar el resultado en porcentaje:

$$\mu\text{g/g}/10.000 = \%P$$

Nota:

La determinación de fósforo total (Pt) en tejido vegetal por el método de digestión por ácido nítrico-perclórico, descrita anteriormente, ha sido tomada de varias fuentes que se mencionan a continuación. Esta metodología ha sido aplicada en CIAT por Ramiro García en el Laboratorio de Nutrición de Plantas, y posteriormente fue modificada por Gonzalo A. Borrero Tamayo en marzo de 2011. A continuación, se enuncia parte de la bibliografía citada y consultada.

**Referencias**

Benton-Jones Laboratories. S. A. Plant Analysis Techniques. Georgia, USA.

Cochrane TT; Barber RG. 1993. Análisis de Suelos y Plantas Tropicales. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Centro de Investigación Agrícola Tropical.

McKean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Murphy J; Riley HP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27: 31–36.

Rao I. 2009. Essential Plant Nutrients and their Functions. Working Document No. 209. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Vitousek PM; Sanford RL. 1986. Nutrient cycling in moist tropical forest. Ann. Rev. Ecol. Syst 17:137–167.

**CONTACTO**

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Determinación de P y N totales en tejido vegetal

Método de digestión ácida ($H_2SO_4 + Se$)

Introducción

El nitrógeno (N) en la planta existe en forma orgánica e inorgánica, en proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, vitaminas y enzimas esenciales para el desarrollo de la misma. Su contenido varía entre 1,5 y 6% según el cultivo. Su deficiencia puede reducir la producción, que las hojas se tornen amarillas y retardar su crecimiento.

El fósforo (P) es un elemento esencial no solo como constituyente de varios compuestos orgánicos, sino también como fósforo inorgánico. Estos cumplen funciones reguladoras fundamentales en la transferencia de energía y almacenamiento en las plantas.

Principio

Se utiliza esta metodología cuando se requiera la determinación de fósforo (P) y de nitrógeno (N) totales en el mismo digestado.

Esta determinación se basa en la digestión de las muestras de tejido de la planta en presencia de ácido sulfúrico y selenio como catalizador (esto promueve la oxidación de N a NH_4) en un bloque de digestión para tubos Taylor, durante 70 min a una temperatura de 330 °C.

Por medio de oxidación, el P se convierte en la forma de fosfato que también se puede leer por colorimetría.

Para el P se utiliza el método de azul de molibdeno (Murphy and Riley, 1962), el cual produce un complejo fosfomolibdico en solución ácida que, a su vez, es reducido por el ácido ascórbico para formar la coloración azul.

Para el N se realiza su determinación con un auto analizador, cuyo principio es colorimétrico (espectrofotometría). En este caso, el análisis es realizado por el Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT.

Equipo

- Digestor de bloque tubos Taylor 50 ml
- Agitador de tubos
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Ácido sulfúrico 96-98% (H_2SO_4)
- Selenio negro (*Noir-black*) 99%
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 99,3%
- Agua bidestilada y desionizada



Solución ácido sulfúrico + selenio ($H_2SO_4 + Se$)

En un matraz erlenmeyer de fondo plano de 2 litros, adicione 3,5 g de selenio negro (polvo catalizador) y 1 litro de ácido sulfúrico concentrado (en este caso, usamos la marca Odal 96-98%). Agite bien, haciendo uso de un magneto, hasta que quede el selenio en suspensión.

Caliente después fuertemente (aprox. 300 °C). Durante el calentamiento, se transformará, poco a poco, la suspensión negra en una solución verde negruzca que después de la ebullición se aclarará enseguida. Permanecerá casi incolora o ligeramente amarillenta. Este proceso lleva varias horas. Deje enfriar la solución para su uso.

Reactivo color para P

Prepare dos soluciones para desarrollo de color.

Solución A

60 g de heptamolibdato de amonio $[(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ en 200 ml de agua bidestilada.

1,455 g de tartrato de antimonio y potasio $(C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O)$ y disuelva en la mezcla anterior.

Agregue lentamente con agitación suave 700 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y deje enfriar para completar a volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Solución B

132 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) y complete a volumen de 1 litro (agua bidestilada)

Solución color

25 ml de solución A

10 ml de solución B

Completar hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada). Prepare la solución cada vez que se vaya a leer.

Solución patrón de P: 50 μg P /ml (50 ppm)

Seque unos gramos de KH_2PO_4 en el horno por 1 hora, a 105 °C, y luego colóquelo en un desecador.

$PM KH_2PO_4 = 136,09 \text{ g/mol}$ $P = 30,97 \text{ g}$

Prepare una solución de 1000 ppm P y de ahí elabore la de 50 ppm P.

$(136,090 \text{ mg } KH_2PO_4 / 30,970 \text{ mg P}) \cdot (1000 \text{ mg} / 1 \text{ g}) = 4,39425 \text{ mg } KH_2PO_4 = 4,39425 \text{ g } KH_2PO_4$

Para 1 litro de solución 1000 ppm $\rightarrow 4,39425 \text{ g } KH_2PO_4$

Pero como la pureza del reactivo es del 99,3% $\rightarrow 4,4252 \text{ g } KH_2PO_4 / \text{litro}$

Nota: se puede preparar menos volumen si no se requiere 1 litro.

Aplicando la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$

$V_1 (1000 \text{ ppm}) = (100 \text{ ml}) (50 \text{ ppm})$

$V_1 = 5 \text{ ml}$

Entonces, debe de tomar 5 ml de la solución de 1000 ppm y completarlo a 100 ml con agua bidestilada y así obtiene una solución de 50 ppm P.

Cálculo para preparación de la curva

Preparada a partir de la solución patrón de 50 $\mu\text{g P/ml}$ (50 ppm)

Aplicando la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$ balones de 100 ml

$$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (0,2 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 0,4 \text{ ml}$$

$$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (0,5 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 1 \text{ ml}$$

$$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (1,0 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 2 \text{ ml}$$

.....

$$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (10 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 20 \text{ ml}$$

Y así sucesivamente con todos los puntos de la curva. Completar en balones de 100 (o 50 ml) con agua bidestilada.

$$V_1 (50 \text{ ppm}) = 100 \text{ ml} (1,0 \text{ ppm}) \rightarrow V_1 = 2 \text{ ml}$$

Tabla resumen

ppm P	Balones de 100 ml	Balones de 50 ml
ml de solución 50 ppm a tomar		
0	0	0
0,2	0,4	0,2
0,5	1	0,5
1	2	1
2	4	2
4	8	4
6	12	6
8	16	8
10	20	10

①→②→③→ Procedimiento

1. Pesar 0,1 g de muestra (tejido vegetal) en tubos Taylor de 50 ml con graduación a 25 ml. Adicionar 1 ml de mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$ y colocarlos en el bloque de digestión (usar cámara para este tipo de ácidos y con la protección requerida) durante 70 min a 330 °C. Incluir patrones de control y duplicar al menos una muestra por tanda (en este caso, se duplica la última).
2. Dejar reposar y completar a volumen de 25 ml con agua desionizada. Agitar muy bien antes de la lectura.
3. En tubos de vidrio de menor volumen, tomar 1 ml de alícuota y posteriormente adicionar 9 ml de agua desionizada (dilución 1:10 para rebajar acidez del extracto).

4. En otros tubos de vidrio de menor volumen, tomar 0,5 ml de alícuota; después adicionar 4,5 ml de reactivo color. Igual tratamiento reciben los puntos de la curva, cuyos patrones deben conservarse refrigerados. Se sacan antes de la lectura y se dejan reposar (0,5 ml de curva y 4,5 ml de reactivo color), excepto el blanco del cual se duplica o triplica los volúmenes. Con este es con el que se ajusta el punto cero de la curva.
5. Agitar muy bien (Vortex) las muestras, dejar mínimo 15 minutos para que se desarrolle el color completamente y proceder a realizar las lecturas en el espectrofotómetro [*Gilford* o *Synergy* (250 μ l)] a una longitud de onda de 660 nm. Leer las muestras el mismo día en que se colorean.



Resultados

A los resultados obtenidos en absorbancia (ABS), se les aplica la ecuación y se obtiene mg P/g de suelo. Luego, se calcula el porcentaje:

$$Y = AX + B$$

Donde Y es la concentración buscada

$$X = \text{ABS}$$

A = constante dada por la ecuación y que representa la pendiente

B = constante dada por la ecuación y que representa el intercepto

Entonces $Y = \text{ABS}(A) + B$ aquí se halla los $\mu\text{g/ml}$ que hay en la solución

Como se pesó 0,1 g, se llevó a $V = 25$ ml y se diluyó 1:10 para rebajar acidez

$\mu\text{g/ml} * (25/0,1) * 10 = \mu\text{g/g}$ aquí, se obtiene la cantidad de P/g de tejido (o ppm)

Para dar el resultado en porcentaje: $\mu\text{g/g} / 10.000 = \%P$

Nota:

La determinación de fósforo y nitrógeno totales en tejido vegetal, por medio del método de digestión ácida ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$) descrita, ha sido tomada de varias fuentes que se mencionan a continuación. Esta metodología ha sido aplicada por Ramiro García en el Laboratorio de Nutrición de Plantas del CIAT y posteriormente modificada por Gonzalo A. Borrero Tamayo en Marzo del 2011. A continuación, se enuncia parte de la bibliografía citada y consultada.

Referencias

Benton-Jones Laboratories, S.A. Plant Analysis Techniques. Georgia, USA.

CIAT. 2007. Manual de métodos de análisis de Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Cochrane TT; Barber RG. 1993. Análisis de suelos y plantas tropicales. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia: Centro de Investigación Agrícola Tropical.

Mckean SJ. 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Murphy J; Riley HP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27: 31-36.

Rao I. 2009. Essential Plant Nutrients and their Functions. Working Document No. 209. Cali, Colombia: CIAT.

Skalar Analytical Bv. 1965. Soil and Plant Analysis. Breda, The Netherlands.

CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de materia seca

Introducción

La materia seca (MS) es la parte que resta de un material tras extraer toda el agua posible a través de un calentamiento hecho en condiciones de laboratorio.

En el laboratorio, el procedimiento consiste en pesar y secar la materia (materia fresca, en su estado natural) en un horno de laboratorio, hasta llegar a una temperatura no mayor de 60 °C. El tiempo que dura el calentamiento dependerá de cada material. Una vez pasado este tiempo, se pesa el residuo, que será la materia seca.

Al mismo tiempo que se extrae toda el agua posible, desaparecen de la muestra componentes orgánicos volátiles como el amoníaco y el alcohol.

La estimación de biomasa y porcentaje de materia seca, en pastizales naturales o pasturas cultivadas, son variables fundamentales en la determinación de carga animal. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que los forrajes verdes tienen mucha agua y poca MS; así, 1 kg de forraje verde tiene entre 90 y 250 g de MS. En consecuencia, la cantidad de agua dependerá de dos factores:

- La especie forrajera: gramíneas o leguminosas
- Y, sobre todo, del estado fenológico del forraje: hojas, encañado, espigado, floración.

Principio

Expresa el contenido de MS de un alimento; se obtiene al secar la muestra en una estufa con circulación forzada de aire a 60 °C hasta obtener un peso constante. De este modo, se elimina el contenido de agua.

Su valor es importante, pues los resultados de todas las demás determinaciones se expresan en base a la materia seca.

Equipo

- Bolsas de papel
- Horno
- Balanza

Reactivos

- No aplica

Procedimiento

1. Pese entre 250 y 1000 g de tejido recién cosechado (ver nota sobre ensayo BNI).
2. Previa identificación y dato del peso de la bolsa, colóquelos al horno a 60 °C durante 6 días.
3. Al cabo de este tiempo, saque las muestras por tandas del horno y anote el peso de la bolsa con la muestra seca.
4. Guarde si es necesario el material vegetal para posible análisis químico. Realice los cálculos de materia seca.

Nota:

En el caso del ensayo de BNI, se cosechan subparcelas de 1 m², de las cuales se toma una muestra de 1 kg para determinar el % de materia seca.

**Resultados**

En la hoja de datos tiene:

- Peso tejido verde (PV) de la subparcela
- Peso tejido verde de la muestra de aprox. 1 kg que se pone a secar
- Peso de la bolsa

Luego de los 6 días de secado, tome nota de:

- Peso de la bolsa con la muestra seca (horno a 60 °C durante días)
- Peso bolsa con tejido seco – peso bolsa = peso tejido seco (PS)

Aplique la fórmula para determinar materia seca en kg/m²:

$$\text{Materia seca (kg/m}^2\text{)} = PV_{\text{subp}} * (\text{PS} / \text{PV})$$

Donde:

PV_{subp} = peso verde (fresco) de la subparcela (1 m²)

PV = peso tejido verde (fresco) de la muestra que se mete al horno (aprox. 1 kg)

PS = peso tejido ya seco, después de secar al horno durante 6 días a 60 °C

Para calcular el % de materia seca:

PS/PV * 100 Bien sea con datos de la subparcela o de la muestra tomada para secar

Para expresar materia seca en toneladas por hectárea:

$$\text{Materia seca (t.ha}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{kg MS.m}^{-2} * 10.000)}{1000}$$

**Referencias**

Laboratorio de Química de Suelos y Nutrición de Plantas. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

**CONTACTOS**

José A. Polanía

j.a.polania@cgiar.org

Jaumer Ricaurte

j.ricaurte@cgiar.org

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Determinación de carbohidratos totales no estructurales (CTNE) en materiales de plantas

Introducción

Los carbohidratos de las plantas se dividen en dos grupos: estructurales (CE) y no estructurales (CNE). Los estructurales (CE) forman parte de la pared celular (Bernal, 1991) y entre estos se encuentran la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. A estos se debe su fibrosidad y no están disponibles para el metabolismo energético de la planta; son insolubles en agua y poseen una fermentabilidad potencial lenta y limitada. La pectina constituye una excepción ya que es completamente fermentable en el rumen (Pichard y Alcalde, 1990).

Los carbohidratos no estructurales (CNE) son una reserva notable de energía y están compuestos por azúcares, almidones y pectinas (Nocek y Russell, 1988). Se almacenan en órganos vegetativos como raíces, rizomas, estolones, coronas y partes inferiores del tallo (Botrel y Gomide, 1981; Tejos, 1983; Reis et al., 1985).

Los CNE juegan un papel importante en el metabolismo intermediario, en la transferencia y almacenamiento de energía. Cada una de estas funciones es dinámica; por lo tanto, su concentración tiene una alta variación según el estado fisiológico de la planta.

Los carbohidratos son extremadamente importantes, desde el punto de vista nutricional,

ya que son la principal fuente de energía en la dieta de los rumiantes. Los CNE son fermentados con rapidez por los microbios ruminales y pueden representar una cantidad sustancial de la energía obtenida por los rumiantes al consumir forrajes. No obstante, cuantitativamente, son de menor importancia con respecto a los carbohidratos estructurales como fuente de energía para los rumiantes (Moore y Hartfield, 1994).

Los principales CNE en los tejidos de especies forrajeras son monosacáridos como la glucosa y la fructosa; disacáridos como la sucrosa y la maltosa; y polisacáridos como los almidones y los fructosanos (McIlroy, 1967; Smith, 1972, 1973). Sin embargo, para la determinación de las reservas, es más relevante analizar los CNE en conjunto [carbohidratos totales no estructurales (CTNE)] que las fracciones individuales al tener funciones similares. Además, la cantidad de CTNE es una estimación de la energía disponible, de forma rápida, para el metabolismo y/o translocación a otras partes de la planta (Smith, 1981). Los CTNE poseen un potencial de fermentación rápida y total en el rumen, al igual que el proceso de fermentación del ensilaje (Pichard y Alcalde, 1990).

Principio

El contenido de carbohidratos totales no estructurales (CTNE) puede ser determinado con el espectrofotómetro, luego de la extracción en medio básico (digestión con solución de NaOH) con antrona preparada en ácido sulfúrico, y de la lectura en un analizador calibrado con glucosa (Kang y Brink, 1995).

 **Equipo**

- Baño María
- Centrifuga
- Agitador de tubos
- Espectrofotómetro

 **Reactivos**

- Hidróxido de sodio (NaOH) 99%
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 95–97% (Merck)
- Glucosa anhidra
- Antrona
- Tiourea
- Agua bidestilada y desionizada

 **Preparación de soluciones**

NaOH 0,5 M: 20 g de NaOH a volumen de 1 litro con agua desionizada.

Glucosa 0,2%: (0,2 g/100 ml agua) Pese 0,1 g de glucosa en balón de 50 ml (agua bidestilada). Esto le dará una concentración de 2,0 mg/ml.

De aquí, tome 1 ml y diluya con agua bidestilada en un balón de 10 ml (dilución 1:10). Así obtendrá una concentración final de 0,2 mg/ml (para preparar la curva).


Reactivo color: para 1 litro (con agua bidestilada).

Pese 0,5 g de antrona, adicione 720 ml de H_2SO_4 y diluya completamente.

En otro beaker, disuelva 0,01 g de tiourea con 280 ml de agua desionizada.

Coloque la solución ácida en un recipiente con hielo y adicione la solución de tiourea (para evitar el sobrecalentamiento de la solución). Deje enfriar por completo antes de usar.

   **Procedimiento**

1. Pese 0,01 g de muestra (tejido vegetal) en tubos plásticos de digestión; adicione 3 ml de solución NaOH 0,5 M (coloque una tapa plástica a cada tubo) y llévelo a baño María a temperatura de 60 °C durante 1½ hora. Incluya patrones control.
2. Deje reposar y traslade el extracto a tubos Eppendorf de 1,5-2,0 ml; tenga la  precaución de dejarlos todos al mismo volumen para colocarlos posteriormente a centrifugar durante 10 min y 14.000 rpm.
3. En tubos de vidrio tome 30 μ l del sobrenadante y adicione 500 μ l de agua bidestilada (volumen final de muestra por tubo: 530 μ l).
4. En tubos aparte, prepare la curva, para la cual se han definido concentraciones, según la fracción de la planta (tallos, hojas, vainas, granos) y de la especie a evaluar (fríjol, forrajes). Lo anterior, a partir de glucosa en una dilución 1:10.

Ver Tablas

5. Una vez tomados los volúmenes de agua y de glucosa requeridos, adicione 30 μl de NaOH 0,5 M para generar una misma matriz y un volumen final de 530 μl .
6. Una vez se tengan las muestras y la curva lista, adicionar 2,5 ml de reactivo color y colocar a baño María (tapar con papel aluminio) y tapa del baño a una $t^\circ = 90^\circ\text{C}$, durante 15 min.
7. Deje reposar y agite en vortex.
8. Con una transferpipeta mida 250 μl y vaya llenando cuidadosamente los pozos. Siempre, trate de mantener el mismo nivel (placa de 96 pozos). En este caso, use la línea A del 1 al 12 para los puntos de la curva y el resto (84) para las muestras.
9. Una vez listas las placas, proceda a la determinación de CTNE en el espectrofotómetro de placas (en este caso un *Biotek Modelo Synergy HT*) a una longitud de onda de 620 nm. El equipo le dará los resultados en ABS y en concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

Cálculo para preparación de la curva

Pese 0,01 g, digeste con 3 ml NaOH 0.5 M, tome 30 μl para lectura:

$$(30 \mu\text{l} / 3000 \mu\text{l}) * 0,01 \text{ g} = 1 \times 10^{-4} \text{ g} \text{ (g de muestra que hay en los } 30 \mu\text{l)}$$

Parta de glucosa en dilución 1:10 \rightarrow 0,2 mg/ml para preparar la curva

p. ej.: si toma 10 μl de glucosa 0,2 mg/ml

$$(10 \mu\text{l} / 1000 \mu\text{l}) * 0,2 \text{ mg} = 2 \times 10^{-3} \text{ mg} \text{ (mg de glucosa que hay en } 10 \mu\text{l)}$$

Como se van a expresar los resultados en mg de glucosa por g de muestra ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), entonces:

$$\text{Para } 10 \mu\text{l glucosa: } 2 \times 10^{-3} \text{ mg} (1 / 1 \times 10^{-4} \text{ g}) = 20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$$

Y así sucesivamente con los demás puntos de la curva.

O puede sacar el factor:

$$(\mu\text{l glucosa} / 1000) * 0,2 \rightarrow \mu\text{l glucosa} * (0,2/1000) = 2 \times 10^{-4} \text{ (primer factor)}$$

$$(1 / 1 \times 10^{-4}) = 10\,000 \text{ (segundo factor)}$$

$$\text{factor 1} * \text{factor 2} = 2 \times 10^{-4} * 10\,000 = 2 \text{ (factor total)}$$

$$\text{Entonces: } \mu\text{l glucosa} * 2 = \text{mg/g}$$

$$20 \mu\text{l glucosa} * 2 = 40 \text{ mg/g}$$

Y así sucesivamente todos los puntos de la curva.

De este modo, ha calculado diferentes curvas teniendo en cuenta las diferentes concentraciones bajas, intermedias y altas según la especie y la fracción de la planta.

Curva para forrajes tropicales

No	mg/g	μl Glucosa	$\mu\text{l H}_2\text{O}$	30 μl NaOH
1	0	0	500	↓
2	0	0	500	
3	20	10	490	
4	40	20	480	
5	80	40	460	
6	120	60	440	
7	160	80	420	
8	240	120	380	
9	320	160	340	
10	360	180	320	
11	400	200	300	
12	440	220	280	

Curva para frijol (tallos, hojas, vainas)

No	mg/g	μl Glucosa	$\mu\text{l H}_2\text{O}$	30 μl NaOH
1	0	0	500	↓
2	0	0	500	
3	40	20	480	
4	80	40	460	
5	160	80	420	
6	240	120	380	
7	320	160	340	
8	400	200	300	
9	480	240	260	
10	560	280	220	
11	640	320	180	
12	720	360	140	

Curva para frijol (grano)

No	mg/g	μl Glucosa	$\mu\text{l H}_2\text{O}$	30 μl NaOH
1	0	0	500	↓
2	0	0	500	
3	60	30	470	
4	120	60	440	
5	240	120	380	
6	360	180	320	
7	480	240	260	
8	600	300	200	
9	720	360	140	
10	840	420	80	
11	960	480	20	
12				

 **Resultados**

Los resultados dados por el equipo vienen expresados en concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), ya que la curva se calibra en estas unidades.

Asimismo, se pueden calcular manualmente mediante la absorbancia (ABS) y aplicando la ecuación de la curva dada por el equipo.

Tanto las muestras como los patrones tienen el mismo procedimiento para la coloración. Por esta razón, no se tiene en cuenta esta dilución para los cálculos.

Nota:

La determinación de carbohidratos totales no estructurales (CTNE) en materiales de plantas, descrita anteriormente, ha sido tomada de varias fuentes que se mencionan a continuación. Esta metodología ha sido aplicada en CIAT por Ramiro García en el Laboratorio de Nutrición de Plantas, y posteriormente fue modificada y adaptada por Gonzalo A. Borrero Tamayo en marzo de 2011.

 **Referencias**

- Bernal EJ. 1991. Pastos y forrajes tropicales; producción y manejo. Bogotá, Colombia: Banco Ganadero.
- Botrel MA; Gomide JA. 1981. Importancia do teor dos carboidratos dos meristemas apicais para a rebrota do campim jarugua [*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf]. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia 10(3):426-441.
- Mcllroy RJ. 1967. Carbohydrates of grassland herbage. Herbage Abstracts 37(2):9-87.
- Moore KJ; Hatfield RD. 1994. Carbohydrates and forage quality. En: Fahey JG; Collins M; Mertens DR; Moser LE (Eds). Forage quality, evaluation and utilization. Wisconsin, USA: ASA-CSSA-SSSA.
- Nocek J; Russell JB. 1988. Protein and carbohydrate as an integrated system. Relationship of ruminal availability to microbial contribution and milk production. J. Dairy Sci 71:2070.
- Pichard G; Alcalde JA. 1990. Determinación de carbohidratos no estructurales. En: Ruiz ME; Ruiz A(Eds). Nutrición de Rumiantes, guía metodológica de investigación. San José, Costa Rica: IICA.
- Reis RA; García R; Gomide JA; Obeid JA. 1985. Efeitos dos regimes de corte nos niveis de carboidratos totais nao-estruturados de campim braquiaria (*Brachiaria decumbens* Stapf.) Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia 14(5):522-528.
- Smith D. 1972. Total non-structural carbohydrates concentrations in the herbages of several legumes and grasses at first flower. Agronomy Journal 64(5):705-706.
- Smith D. 1973. Influence of drying and storage conditions on nonstructural carbohydrate analysis of herbage tissue; a review. Grass and Forage Science 28:129-134.
- Smith D. 1981. Removing and analyzed total non-structural carbohydrates from plant tissue. University of Wisconsin (Research Report R-2107).
- Tejos MR. 1983. Efecto de niveles de carbohidratos no estructurales totales en el rebrote de *Stylosanthes capitata* Vog (Tesis de maestría). UCR-CATIE. Turrialba, Costa Rica. 56 p.

 **CONTACTO**

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Determinación de cenizas en tejido vegetal

Método gravimétrico

Introducción

Las cenizas representan el contenido en minerales, que junto con el agua, son los únicos componentes de los alimentos que no se pueden oxidar en el organismo para producir energía; por el contrario, la materia orgánica comprende los nutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) que se pueden quemar (oxidar) en el organismo para obtener energía. Así, es posible calcular esta última a partir de la diferencia entre el contenido en materia seca del alimento y el contenido en cenizas.

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. Estas representan el contenido mineral, es decir, el conjunto de nutrientes elementales que están

presentes en determinada muestra. Para llevar a cabo su análisis, se realiza la incineración total de la muestra a temperaturas elevadas y se determina su masa.

Algunos errores y dificultades involucrados en la determinación de las cenizas en seco son: la pérdida de ceniza debido a la intensidad con que arde la flama en el momento de quemar la muestra al aire; el cambio gradual en las sales minerales con el calor (p. ej., de carbonatos a óxidos); la adhesión de las muestras con un contenido alto de azúcares, lo cual puede ocasionar pérdida de esta y la fusión del carbón a partes no oxidadas atrapadas de la muestra.

Principio

La técnica utilizada es la de cenizas en seco. Consiste en quemar la muestra en una mufla para eliminar todo el material orgánico.

Las cenizas se determinan como el residuo que queda al quemar, en un horno o mufla, los componentes orgánicos a 550 °C durante aproximadamente 2–5 h. El remanente es el residuo inorgánico. La medición de la ceniza total es útil en el análisis de alimentos, ya que se puede evidenciar la presencia de minerales contenidos en la muestra.

Equipo

- Mufla regulada a 550 ± 25 °C
- Balanza analítica, sensibilidad 0,1 mg
- Crisoles o cápsulas de porcelana (se puede usar de sílice o platino)
- Desecador con deshidratante adecuado (sílica gel como indicador de humedad)

Procedimiento

1. Pese en un crisol previamente calentado (W_{cr}) (tarar previamente la balanza) 0,5 gramos de muestra homogenizada (W_m).
2. Coloque en la mufla e incinerar a 550 °C por 2 horas, hasta obtener cenizas blancas o grisáceas. (Se puede precalcinar previamente la muestra en horno calefactor. Evite que se inflame).

3. Una vez sacadas de la mufla, deje enfriar en desecador y pese ($W_{Cr} + C_z$). Es importante en este paso no dejar que las muestras tomen humedad del medio ambiente.



Resultados

$$\% \text{ Cenizas totales} = \frac{(W_{Cr} + C_z - W_{Cr}) \times 100}{(W_{Cr} + m - W_{Cr})}$$

Donde:

$W_{Cr} + C_z$ = masa en gramos del crisol con las cenizas

$W_{Cr} + m$ = masa en gramos del crisol con la muestra

W_{Cr} = masa en gramos del crisol vacío

Expresar el resultado con 2 decimales.

Repetibilidad: la diferencia de los resultados no debe ser superior al 2% del promedio.

Otra forma de expresar los resultados es:

Peso ceniza = peso crisol + ceniza – peso de crisol

$WC_z = WC + C_z - WC$

$\% C_z = WC_z (100/0,5)$ donde 0,5 es el peso de la muestra

O con factor:

$\% C_z = WC_z (200)$

Referencias

Harris LE. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. En: Manual de métodos analíticos, Laboratorio Servicios Analíticos. Cali: Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

 CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Capítulo 3

Protocolos de análisis en suelo

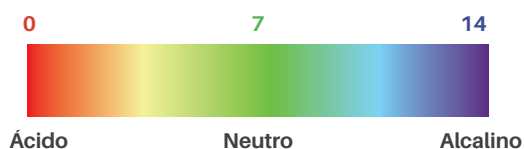
Determinación de pH en suelos

Introducción

La determinación del pH está basada en la medida del potencial o actividad de hidrógeno ionizado (H^+) en la solución del suelo.

En general, el pH va de 0 a 14 en disolución acuosa. Es ácida cuando el valor del pH es menor de 7 (hay más protones en la disolución) o alcalina si el pH es mayor de 7. El $pH = 7$ indica que la solución es neutra (donde el disolvente es agua).

Además del método potenciométrico, es posible medir (de forma aproximada) el pH de una disolución



Escala de pH

con el empleo de indicadores, ácidos o bases débiles que presentan color diferente según el pH. Generalmente, se emplea papel indicador (impregnado de una mezcla de indicadores cualitativos para la determinación del pH) y el papel de litmus o tornasol, el cual es considerado el mejor de estos. Otros indicadores usuales son la fenolftaleína y el naranja de metilo.

La determinación del pH es uno de los procedimientos analíticos más relevantes y usados en las ciencias (química, bioquímica y la química de suelos). El pH determina muchas características notables de la estructura y actividad de las biomacromoléculas y, por tanto, del comportamiento de células y organismos.

En cultivos en general, el pH de la solución nutritiva del suelo en contacto con las raíces puede afectar el crecimiento vegetal de dos formas principalmente:

- Al alterar la disponibilidad de los nutrientes: para que el aparato radical los absorba, estos deben estar disueltos. En consecuencia, valores extremos de pH pueden provocar la precipitación de algunos; por lo tanto, permanecerían en forma no disponible para las plantas.
- Al perturbar el proceso fisiológico de absorción de los nutrientes por parte de las raíces: todas las especies vegetales presentan unos

rangos característicos de pH en los que su absorción es idónea. Fuera de este rango, la absorción radicular se hace difícil; asimismo, si la desviación en los valores de pH es extrema, puede verse deteriorado el sistema radical o presentarse toxicidad a causa de la excesiva absorción de elementos fitotóxicos (p. ej., aluminio).

Así, el pH es uno de los parámetros que mejor refleja las propiedades químicas del suelo. Es un factor que determina la disponibilidad de muchos de los elementos necesarios para el crecimiento de las plantas.

Principio

Método potenciométrico para la determinación de pH

El valor del pH se puede medir de forma precisa mediante un potenciómetro (también conocido como pH-metro). Este instrumento mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata/cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ion de hidrógeno.

La relación usada para la medida es de 1:1 (suelo: agua).

Equipo

- Material para realizar la mezcla suelo-agua
- Varilla agitadora
- Frasco lavador
- pH-metro (potenciómetro)

Reactivos

- Soluciones buffer pH 7 y pH 4 (conservarlas refrigeradas)
- Agua desionizada

Procedimiento

1. Pese 10 g de suelo y adicione 10 ml de agua desionizada.
2. Agite completamente y dejar reposar por 30 min.
3. Realice las lecturas, previa calibración del pHmetro (con soluciones estándar de pH 7 y 4); agite cada muestra antes de cada lectura.
4. El electrodo debe estar lavado con agua desionizada y secado con papel suave después de cada lectura.



Resultados

El valor es una medida directa y se expresa como pH.



Referencias

Cochrane TT; Barber RG. 1993. Análisis de Suelos y Plantas Tropicales. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia: Centro de Investigación Agrícola Tropical.

Mckean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).



CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Determinación de conductividad eléctrica (CE)

Introducción

La facilidad con que la planta puede aprovechar el agua en el suelo depende no solamente de su cantidad, sino también de la concentración de sales disueltas en solución.

La presión osmótica de la solución aumenta con un incremento del contenido de sales e incrementa la dificultad que tiene la planta para aprovechar el agua. La tolerancia de los cultivos a la salinidad está relacionada con la conductividad eléctrica del extracto saturado del suelo.

El término sales solubles cubre un amplio rango de aniones y cationes presentes en el suelo, bien sea en forma de cristales – disueltos en solución o disueltos en la materia orgánica.

Dichas sales generalmente son asociadas en combinaciones con elementos mayores, como los

cationes Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} y con aniones como Cl^- , HCO_3^- , NO_3^- , CO_3^{-2} , SO_4^{-2} .

La salinidad está asociada a suelos de regiones secas y cercanas al mar (salinidad primaria). Las tierras bajo riego usualmente presentan características salinas (salinidad secundaria o antropogénica), inducida por la mala calidad de las aguas de riego, por fertilización o por malas prácticas agrícolas, especialmente por la ausencia de drenajes.

Las sales más comunes reconocidas en suelos son el cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), sulfatos de sodio, potasio, magnesio y aluminio y carbonatos de sodio.

La solubilidad de las sales generalmente incrementa con la temperatura (aprox. 2% por grado).

Salinidad de suelos (Richards, 1954)

Clasificación	Conductividad eléctrica (mS cm^{-1} o dS m^{-1})	Significado agronómico
No salino	< 2,0	Efecto de salinidad casi nulo
Poco salino	2,0 - 4,0	Los rendimientos de los cultivos más sensibles pueden ser restringidos
Moderadamente salino	4,0 - 8,0	Se reducen los rendimientos de muchos cultivos
Muy salino	8,0 - 16,0	Solo los cultivos tolerantes rinden satisfactoriamente
Extremadamente salino	> 16	Solo unos cultivos muy tolerantes rendirán satisfactoriamente

La salinidad tiene efectos benéficos sobre el suelo, principalmente en relación al desarrollo de la estructura. Solo en casos de concentraciones elevadas de iones, como boratos y cloruros, pueden afectar a los cultivos por toxicidad directa.

En el caso del sodio (Na), este tiene un efecto negativo con relación a la estabilidad de agregados. Participa en la dispersión de coloides de tal forma que las propiedades físicas, como conductividad hidráulica, de aire y de iones, se ven fuertemente afectadas.

Principio

La conductividad eléctrica (CE) es proporcional a la naturaleza y la cantidad de las sales disueltas en la solución.

Se puede estimar la salinidad del suelo de una manera rápida y aproximada, midiendo la conductividad eléctrica del extracto del suelo.

Esta es una medida de la propiedad que poseen las soluciones acuosas para conducir corriente eléctrica, la cual depende de la presencia de iones, su concentración, movilidad, valencia y de la temperatura de la medición.

Ya que la conductividad eléctrica y la concentración de sales en una solución acuosa están íntimamente relacionadas, la CE es comúnmente empleada como una expresión de la concentración total de sales disueltas en una muestra acuosa, teniendo en cuenta que esta puede ser afectada por la temperatura, la movilidad, valencias y concentraciones relativas de iones individuales presentes en la solución. El agua por sí sola es poco conductora de la electricidad.

Su determinación está basada en el principio de los puentes de Wheatstone. En este caso, el conductímetro o potenciómetro lleva dos electrodos de platino usualmente cubierto con platino negro, el cual reduce la resistencia en la interfase electrodo-solución. Alternadamente un voltaje alto es aplicado a los electrodos para medir la resistencia.

El método utilizado es la referencia internacional recomendada por el laboratorio de salinidad de Riverside, USA (Richards, 1954). Este método se ha estandarizado llevando la muestra a saturación (pasta de saturación), la cual se prepara adicionando agua desionizada a una muestra seca al aire, mezclando muy bien hasta que el suelo quede saturado y no haya agua sobrante sobre la superficie.

Se debe obtener una pasta suelo-agua saturada y equilibrada. Posteriormente, se deja esta mezcla en reposo por varias horas para permitir que el agua penetre completamente en las partículas del suelo y disuelva rápidamente las sales solubles presentes.

Otras relaciones suelo-agua, tales como 1:1, 1:5, etc., pueden resultar más fáciles de usar que la pasta de saturación, pero tienen una relación menos significativa con las propiedades del suelo y están más sujetas a errores resultantes de la pectización, hidrólisis, intercambio catiónico y disolución mineral.

La conductividad o conductancia es el inverso de la resistencia específica y se expresa en micromho por centímetro ($\mu\text{mho/cm}$), equivalentes a microsiemens por centímetro ($\mu\text{S/cm}$) o milisiemens por centímetro (mS/cm) en el Sistema Internacional de Unidades:

$$1 \text{ S m}^{-1} = 10 \text{ dS m}^{-1} = 10 \text{ mS cm}^{-1} = 10 \text{ mmhos cm}^{-1} = 1,000 \text{ mS m}^{-1} = 10,000 \mu\text{S cm}^{-1}.$$

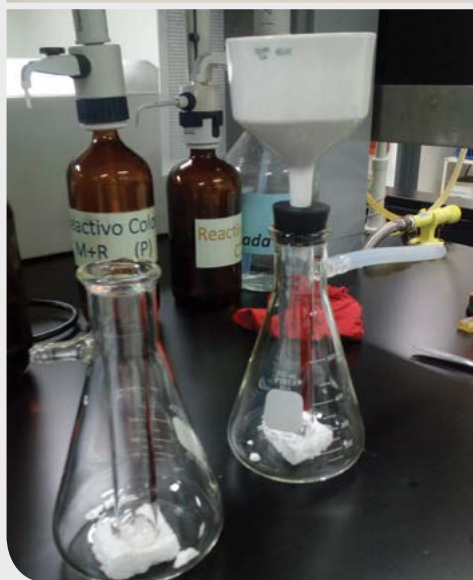
Método potenciométrico para la determinación de CE

El suelo se seca al aire (2–3 días) y se tamiza a 2 mm.

Utilice un conductímetro (en nuestro caso, Hanna HI5522), previo encendido y calibración. Verifique que la pantalla esté en el canal 2 (CE). No requiere sonda de temperatura, pues él mismo hace la corrección y expresa el resultado a 25 °C. El volumen de solución obtenido debe ser suficiente para que el electrodo detecte la señal.

Equipo y materiales

- Balanza
- Recipiente para realizar la mezcla suelo-agua
- Espátula
- Dispensador de agua
- Sistema de filtrado al vacío
- Papel filtro *Whatman* (usamos # 2 o 5)
- Tubos para coleccionar la muestra
- pH-metro – CE (potenciómetro)



Reactivos

- Soluciones de calibración para conductividad (1.4 mS/cm y 12.88 mS/cm).
- Agua desionizada.

①→②→③→ Procedimiento

1. Pese 50 g (suelos de los Llanos o de Cauca) o 60 g de suelo CIAT secado al aire y tamizado a 2 mm en un recipiente y adicione agua desionizada poco a poco, mezclando bien con una espátula hasta formar una pasta saturada. El suelo debe fluir fácilmente en el vaso sin que se vea exceso de agua en la superficie, la cual se ve brillante.
2. Dejar la suspensión en reposo al menos durante 1 hora (la literatura sugiere 1–4 horas o durante la noche, si son suelos muy orgánicos o suelos con yeso [sulfato de calcio]).
3. Una vez verificada la pasta de saturación, filtrar (*Whatman 2* o 5) en un sistema de vacío, hasta obtener la solución del suelo. Realizar el montaje de un sistema de extracción con embudo Buchner u otro sistema del que se disponga. Presión usada: 18–23 in Hg. El tiempo varía entre 5 a 20 minutos según el suelo.
4. Una vez filtrada la muestra, se procede a realizar las lecturas previa calibración del conductímetro (en nuestro caso, un Hanna HI5522-01) con patrón alto y bajo de CE. El electrodo se debe lavar con agua desionizada y secar con papel suave después de cada lectura.

Nota:

En nuestro caso particular, expondremos los pesos y volúmenes usados según el sitio de colección del suelo (Colombia) y los tiempos de reposo y vacío:

Suelo (sitio)	Peso de suelo (gr)	Volumen aprox. de agua Adicionada para pasta saturación (ml)	Tiempo en reposo para la pasta de saturación (hora)	Tiempo aprox. de succión al vacío (min)
Carimagua, Llanos Orientales	50	20 - 22	1	5
Santander de Quilichao, Cauca	50	22 - 24	1	8
CIAT - Palmira, Valle	60	23 - 26	1	8 - 15

El volumen mínimo para lecturas es de 5 ml, en el cual los anillos del electrodo quedan cubiertos por la solución.



Resultados

El valor es una medida directa y se expresa como mS/cm o dS/m a 25 °C.

Microsiemens ($\mu\text{S}/\text{cm}$) o milisiemens por centímetro (mS/cm) en el Sistema Internacional de Unidades.

$$1 \text{ S m}^{-1} = 10 \text{ dS m}^{-1} = 10 \text{ mS cm}^{-1} = 10 \text{ mmhos cm}^{-1} = 1,000 \text{ mS m}^{-1} = 10,000 \mu\text{S cm}^{-1}$$

Si se desea conocer el contenido de agua en la pasta saturada (SW):

$$SW = W_w/W_s * 100$$

En donde:

W_w = Peso del agua adicionada

W_s = Peso del suelo seco

Nota:

Montaje adaptado por Gonzalo Antonio Borrero y Diana Patricia Higuera para el Laboratorio de Nutrición y Fisiología de Plantas del CIAT. Abril–Mayo 2017.

Referencias

- Cochrane TT; Barber RG. 1993. Análisis de suelos y plantas tropicales. Centro de Investigación Agrícola Tropical. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1999. Soil salinity assessment: Methods and interpretation of electrical conductivity measurements. Irrigation and drainage paper 57. Roma, Italia. pp 5–14. Disponible en: www.fao.org/docrep/019/x2002e/x2002e.pdf
- Mckean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejidos Vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías. Documento de Trabajo No. 129. Laboratorio de Servicios Analíticos, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Pansu M; Gautheyrou J. 2003. Handbook of Soil Analysis. Mineralogical, Organic and Inorganic Methods. Springer Berlin, Heidelberg New York. p 605.
- Richards LA. 1954. Agriculture Handbook 60. US Department of Agriculture (USDA). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. p 88.
- Salinas JG; García R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Manual de Laboratorio CIAT.
- Vásquez Alarcón A. 2009. Interpretación del análisis químico de suelo y agua. p 8.

CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Determinación de fósforo (P) en suelo - Método Bray II (P disponible en suelos ácidos)

Introducción

Fósforo. La determinación del fósforo (P) en el suelo es esencial para establecer las recomendaciones de fertilizantes fosfatados y, así, obtener los máximos rendimientos agronómicos y beneficios económicos (Zapata y Fardeau, 1998). Por tanto, para diagnosticar si es necesario fertilizar o no es imprescindible utilizar métodos químicos que permitan estimar la disponibilidad de fosfatos en los suelos y sus transformaciones con la aplicación de fertilizantes.

La disponibilidad de P en el suelo corresponde a una pequeña fracción del total. Esta refleja la parte utilizable en solución, y aquella que se encuentra en la fase sólida, susceptible de ser asimilada por las plantas.

El P forma compuestos débilmente solubles con cationes divalentes y monovalentes. Por esta razón, la cantidad de P en la solución del suelo es muy pequeña. Las plantas que crecen absorben esta pequeña cantidad que, a su vez, se encuentra en equilibrio con el P de la fase sólida.

De este modo, cada una de las formas químicas del suelo contribuye de manera distinta a enriquecer el P disponible para el cultivo.

El contenido de P disponible en el suelo es una variable dinámica estrechamente influenciada por las propiedades del suelo, la planta y las condiciones ambientales.

Cualquier cambio en las propiedades del suelo se encuentra relacionado con la concentración de P en solución (intensidad); la magnitud del P de la fase sólida del suelo susceptible de pasar a la solución o P lábil (cantidad); la capacidad del suelo de restablecer el P de la solución (capacidad o poder tampón del P); y las características del suelo que permiten el paso de iones fosfato (PO_4^{-3}) desde las zonas de alta concentración a la superficie de las raíces (difusión). Lo anterior explica los cambios en la cantidad del P disponible. Para lectura del potasio presente, se emplea este mismo extracto.

Potasio. Es uno de los tres nutrientes minerales que necesitan las plantas en mayor concentración. Estas absorben el potasio que se encuentra en la solución del suelo en forma del catión K^+ . La cantidad de K en la solución está en función o controlada por la liberación del potasio intercambiable localizado, en general, alrededor de las partículas (micelas) de arcilla.

De esta manera, los cultivos extraen grandes cantidades de potasio del suelo para su crecimiento y desarrollo. Como es de esperarse, la falta de este elemento, influye negativamente en el rendimiento y calidad del cultivo.

Además, la deficiencia de potasio aumenta su vulnerabilidad a enfermedades y lo hace menos resistente a condiciones de estrés tales como sequías, heladas etc.

Principio

En 1945, Bray y Kurtz proponen un método rápido para estimar las formas de fósforo disponible para las plantas. Este método es conocido como Bray I y se trata de una extracción con una solución de NH_4F 0,03 N y HCl 0,025 N. Se basa en el efecto solubilizador del H^+ sobre el P del suelo y la capacidad del ion F^- de bajar la actividad del Al^{+3} ; así, se evita la readsorción de los fosfatos en el sistema de extracción (Soil and Plant Analysis Council, 1992; Kuo, 1996).

La solución extractora Bray II (HCl 0,1 M y NH_4F 0,03 M), al igual que el Bray I, disuelve algunos fosfatos fácilmente solubles en ácido, como los fosfatos de calcio y una parte de los fosfatos de hierro

y aluminio por medio de la formación de complejos con el ion fluoruro, pero con mayor capacidad extractora.

Este método es muy usado en suelos ácidos con bajos contenidos de nutrientes.

Se determina el fosfato por colorimetría con el método de molibdato de amonio (coloración azul), con ácido ascórbico como agente reductor (Murphy and Riley, 1962).

En suelos calcáreos, el efecto del ácido se ve disminuido debido a su neutralización por el CaCO_3 en el suelo. Por esta razón, el método no es indicado para suelos con $\text{pH} > 6,8$.



Equipo

- Material para preparar soluciones y coleccionar extractos
- Papel filtro
- Agitador horizontal con control de tiempo (o reloj)
- Transferpipeta
- Espectrofotómetro



Reactivos

- Ácido clorhídrico 37% d = 1,19 k/l HCl
- Fluoruro de amonio NH_4F
- Heptamolibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Tartrato de antimonio y potasio $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Ácido sulfúrico 96–98% H_2SO_4
- Ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
- Dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4



Preparación de soluciones

NH₄F 1N: 37 g de NH₄F/1 litro de H₂O

HCl 1N: 82,8 ml de HCl concentrado/1 litro de H₂O

Solución extractora (Bray II)

Para 1 litro de solución, mida 30 ml de NH₄F 1 N y 100 ml de HCl 1 N, lo cual da una concentración final de NH₄F 0,03 N y HCl 0,1 N.

Reactivo color (M+R)

Solución A

60 g de heptamolibdato de amonio en 200 ml de agua (bidestilada);

1,455 g de tartrato de antimonio y potasio, disuelva en la mezcla anterior.

Agregue lentamente con agitación suave 700 ml de ácido sulfúrico concentrado y deje enfriar para completar al volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Solución B

132 g de ácido ascórbico y complete hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Solución color (Murphy and Riley, 1962)

25 ml de solución A

10 ml de solución B

Complete hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada)

Prepare solución, cada vez que se vaya a leer.

Es mejor realizar cálculos y preparar esta solución dependiendo del número de muestras a leer y los puntos de la curva.

Solución patrón de P: 50 µg P/ml (50 ppm)

Seque unos gramos de KH_2PO_4 (dihidrógeno fosfato de potasio) en el horno por 1 hora, a 105 °C y colóquelo en un desecador. $\text{PM KH}_2\text{PO}_4 = 136,09 \text{ g/mol}$ $\text{P} = 30,97 \text{ g}$

Pese 0,22 g del reactivo seco (pureza 99,5%) y disuélvalo en agua bidestilada. Luego, complete hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Preparación de la curva

Se prepara a partir de la solución patrón de 50 µg P/ml

ppm P	Balones de 100 ml	Balones de 50 ml
ml de solución. Patrón a tomar		
0	0	0
0,25	0,5	0,25
0,5	1	0,5
0,75	1,5	0,75
1	2	1
1,5	3	1,5
2	4	2
4	8	4

① → ② → ③ → Procedimiento

1. Pese 2,85 g de suelo (cernido con un tamiz de 2 mm de diámetro) en frascos plásticos de 50 ml.
2. Adicione 20 ml de solución extractora de Bray II recién preparada.
3. Agite la muestra durante 40 segundos.
4. Filtre la suspensión inmediatamente a través de papel filtro (*Whatman* No. 5).
5. En tubos de vidrio, mida 0,5 ml del extracto o de patrón y añada 4,5 ml de la solución de desarrollo de color (A+B). Mezcle bien y espere 15 minutos para leer (de igual manera para los diferentes puntos de la curva y blancos).
6. Traslade cuidadosamente, con transferpipeta, 250 µl de cada muestra a cada pozo del plato (placa multipozos), tratando de adicionar la misma cantidad cada vez e identificando muy bien las muestras. Realice la lectura directamente en el espectrofotómetro. En el laboratorio del CIAT, se lee en el equipo *Synergy* HT (*BioTek* Co.) usando placas multilectura o en el *Gilford* por succión.

7. Calibre el espectrofotómetro de UV-VIS con los patrones (curva) a una longitud de onda de 660 nm usando concentración o absorbancia.
8. Lea las muestras y calcule la concentración de fósforo en $\mu\text{g P g}^{-1}$ (ppm) de suelo.

Nota: Enviar el extracto para realizar la lectura del potasio (K) al Laboratorio de Servicios Analíticos para ser leído por absorción atómica.



Resultados

Mediante la ecuación lineal determinar las concentraciones y expresarlas en mg.kg^{-1} .

Nota:

Esta metodología es usada en el laboratorio de Química de Suelos de CIAT, adaptada para lecturas de reactivos con volúmenes menores, por Gonzalo Antonio Borrero Tamayo en el 2010. A continuación se enuncia parte de la bibliografía citada y consultada.



Referencias

- Kuo S. 1996. Phosphorus. En: Methods of Soil Analysis. USA: SSSA - ASA.
- Mckean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Murphy J; Riley HP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27:31-36.
- Soil and Plant Analysis Council. 1992. Handbook on reference methods for soil analysis. USA.
- Zapata F; Fardeau JC. 1998. Metodologías isotópicas en estudios sobre fósforo. En: Casanova E. (Ed.). Manejo eficiente de los recursos fosfatados con énfasis en rocas fosfóricas de aplicación directa. Venezuela: Universidad Central de Venezuela, OIEA/FAO.



CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de fósforo total (Pt) en suelos

Método digestión ácida (nítrico - perclórico)

Introducción

La deficiencia del fósforo (P) en los suelos del trópico y subtropical es un problema cuya magnitud constituye una de las limitantes de mayor trascendencia en la producción de las cosechas.

El fósforo total (Pt) del suelo es provisto por el material parental o por el agregado de fertilizantes o abonos.

Así, los materiales parentales, en su mayoría, contienen fosfatos de calcio, los que se hidrolizan durante el desarrollo del suelo.

El contenido de Pt es una propiedad primaria del suelo y, por lo tanto, no depende de ninguna otra variable. Las fracciones más lábiles son dependientes de las propiedades físicas y químicas

pero pueden, al mismo tiempo, controlar otras variables, tal como la acumulación de materia orgánica (MO) (Cole and Heil, 1981).

En suelos no fertilizados, los valores más altos se presentan cuando el material parental está formado por rocas eruptivas de reacción básica, y en suelos con elevado contenido de MO (Wild, 1992).

El Pt varía según la textura: cuanto más fina, mayor será su contenido. En los suelos de áreas tropicales, este parece estar ligado a la MO y a su evolución pedológica. Al aumentar la concentración de MO y los fosfatos orgánicos, se obtiene una mayor cantidad de Pt (Fassbender y Bonermisza, 1987).

Principio

A través de la digestión ácida, se llevan todas las formas de P presentes en la muestra (P reactivo, P hidrolizable y P orgánico) a formas ortofosfato. Posteriormente, se cuantifican por medio del método colorimétrico con espectrofotometría visible a longitud de onda de 660 nm. El método usado es el del molibdato de amonio (coloración azul) con ácido ascórbico como agente reductor (Murphy y Riley, 1962).

Equipo

- Material para preparar soluciones y tubos Taylor graduados a 25 ml
- Bloque de digestión
- Cabina extractora resistente a ácidos nítrico y perclórico
- Transferpipeta
- Espectrofotómetro

Reactivos

- | | |
|--|----------------------------------|
| • Ácido nítrico 65% | HNO_3 |
| • Ácido perclórico 70-72% | HClO_4 |
| • Heptamolibdato de amonio
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | |
| • Tartrato de antimonio y potasio
$\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | |
| • Ácido sulfúrico 96-98% | H_2SO_4 |
| • Ácido ascórbico | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ |
| • Dihidrógeno fosfato de potasio | KH_2PO_4 |



Preparación de soluciones

Solución ácida

Ácido nítrico-perclórico relación 2:1

Para 1 litro: 667 ml de ácido nítrico
333 ml de ácido perclórico

Reactivo color (M+R)

Solución A

60 g de heptamolibdato de amonio en 200 ml de agua (bidestilada)

1,455 g de tartrato de antimonio y potasio; disuelva en la mezcla anterior.

Agregue lentamente con agitación suave 700 ml de ácido sulfúrico concentrado y deje enfriar para completar al volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Solución B

132 g de ácido ascórbico y complete hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada)

Solución color (Murphy y Riley, 1962)

25 ml de solución A

10 ml de solución B

Complete hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada). Es recomendable que realice los cálculos y prepare la solución cada vez que vaya a leer (según el número de muestras y los puntos de la curva).

Solución patrón de P: 50 µg P/ml (50 ppm)

Seque unos gramos de KH_2PO_4 (dihidrógeno fosfato de potasio) en el horno por 1 h, a 105 °C y colóquelo en un desecador.

PM $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136,09 \text{ g/mol}$ P = 30,97 g

Pese 0,22 g del reactivo seco (pureza 99,5%) y disuélvalo en agua bidestilada. Luego, complete hasta un volumen de 1 litro (agua bidestilada).

Preparación de la curva

Se prepara a partir de la solución patrón de 50 µg P/ml

ppm P	Balones de 100 ml	Balones de 50 ml
ml de solución. Patrón a tomar		
0	0	0
0,5	1	0,5
1	2	1
2	4	2
4	8	4
6	12	6
8	16	8
10	20	10

① → ② → ③ → Procedimiento

1. Pese 0,1 g de suelo en tubos Taylor de 50 ml.
2. Adicione 5 ml de solución ácida nítrico-perclórico 2:1.
3. Deje con ácido hasta el día siguiente (predigestión); en particular, cuando el suelo tenga mucha materia orgánica.
4. Coloque al bloque digestor a 200 °C durante 1 hora.
5. Deje enfriar y complete hasta un volumen de 25 ml con agua desionizada.
6. Tape los tubos y agite. Deje decantar hasta que la solución se aclare.
7. En tubos de vidrio, mida 1 ml (0,5 ml) del extracto o de patrón y añada 9 ml (4,5 ml) de la solución de desarrollo de color (A+B). Mezcle bien y espere 15 minutos para leer (proceda de igual manera para los diferentes puntos de la curva y blancos). Mezcle bien y espere 15 minutos para leer.
8. Con cuidado, traslade con transferpipeta 250 μ l de cada muestra a cada pozo del plato (placa multipozos). Cada vez, trate de adicionar la misma cantidad e identifique muy bien las muestras o lea directamente en el Gilford.
9. Calibre el espectrofotómetro de UV-VIS con los patrones (curva) a una longitud de onda de 660 nm usando concentración o absorbancia.
10. Si dispone de un equipo *Synergy* HT (*BioTek* Co.), usará placas multilectura o en el *Gilford* será por succión. Lea las muestras y calcule la concentración de fósforo en μ g P g⁻¹ (ppm) de suelo.



Resultados

A los resultados obtenidos en ABS, aplique la ecuación y obtendrá mg P/g de suelo; luego, calcule el porcentaje:

$$Y = AX+B$$

Donde Y es la concentración buscada

$$X = \text{ABS}$$

A = constante dada por la ecuación y que representa la pendiente

B = constante dada por la ecuación y que representa el intercepto

Tenga en cuenta los pesos y volúmenes usados cuando realice los cálculos.

Mediante ecuación lineal determine las concentraciones y expresaselas en mg.kg⁻¹.

Nota:

Esta metodología es usada en el Laboratorio de Química de Suelos de CIAT y ha sido adaptada para realizar lecturas con volúmenes menores por Gonzalo Antonio Borrero Tamayo en el 2010. A continuación, se enuncia parte de la bibliografía citada y consultada.

 **Referencias**

Bray RH; Kurtz LT. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59:39–45.

Cole CV; Heil RD. 1981. Phosphorus effects on terrestrial nitrogen cycling. *Ecol. Bull* 33: 363–374.

Fassbender H; Bornemisza E. 1987. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. 420 p. San Jose, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Kuo S. 1996. Phosphorus. En: *Methods of Soil Analysis*. 868–919. SSSA - ASA.

Mackean SJ. 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teórica y práctica de metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.

Murphy J; Riley HP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31–36.

Soil and Plant Analysis Council. 1992. Handbook on reference methods for soil analysis. USA: Soil and Plant Analysis Council.

Wild A. 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Madrid, España: Mundi-Prensa.

 **CONTACTO**

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Protocolo de muestreo de suelos para determinación de carbono

Introducción

El cambio climático ha venido afectando de forma adversa los procesos ecológicos en el planeta. Esto ha ocasionado graves consecuencias económicas y sociales (IPCC, 2001). Principalmente, este fenómeno es consecuencia de los incrementos en las emisiones y la acumulación atmosférica de gases de efecto invernadero (GEI). Dentro de los cuales se destaca el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O). Las emisiones de carbono (C) por actividades antropogénicas se han incrementado considerablemente durante el último siglo; en su mayoría, a causa del uso de combustibles fósiles y cambios en el uso de la tierra (Lal et al., 1998). Este último genera cerca del 23% de las emisiones de CO_2 , en particular, por la pérdida de biomasa aérea y por la descomposición del C orgánico del suelo (Houghton, 1999).

La literatura convencional estima que un 15% de los GEI provienen de la agricultura, y que alrededor del 50% de esas emisiones resultan de la ganadería. Varios autores han propuesto el manejo adecuado de pastizales como una alternativa para reducir la emisión de GEI y mejorar el balance de C en los ecosistemas agrícolas (Fisher et al., 1994; Smith et al. 2008).

Este protocolo tiene como objetivo estimar el potencial de las pasturas mejoradas —bien manejadas— para incrementar el almacenamiento de C en el suelo, en comparación con otras sin manejo apropiado, y a la sabana nativa, que son los sistemas de uso de la tierra predominantes en la altillanura plana colombiana.

Principio

Los suelos contienen la mayor reserva terrestre de C orgánico en interacción con la atmósfera. Estos almacenan una cantidad considerablemente mayor que la vegetación. La materia orgánica del suelo (MOS) es un indicador primordial de la calidad del suelo, tanto en términos de producción primaria como de captura de C y de la calidad del aire a nivel ambiental. La MOS en su composición es compleja y heterogénea y, en general, altamente sensible a los cambios en el uso de la tierra (Gregorich et al., 1996; Cambardella, 1998). La MOS evoluciona gracias a la influencia de factores como la vegetación (composición y reciclaje), condiciones de temperatura y humedad, actividad de la macro y microfauna (en especial, la microbiana), propiedades del suelo (textura, acidez, contenido y mineralogía de arcillas), y otros factores relacionados con la fertilización del suelo (nitrógeno, fósforo o azufre) y el riego.

La captura y almacenamiento de C en los suelos es fundamental dentro del contexto actual de la búsqueda de opciones para mitigar el calentamiento global. Los bosques tropicales cubren grandes áreas y son prioritarios para la salud del planeta. A su vez, las pasturas permanentes o las tierras de pastoreo también juegan un papel importante en la captura de C. Las reservas de C en suelos de tierras de pastoreo son estimadas en 70 t/ha, cifra similar a las cantidades almacenadas en los suelos forestales (Trumbmore et al., 1995; Balesdent y Arrouays, 1999).

Durante las últimas décadas, el desarrollo agropecuario global ha llevado a la conversión, a largo plazo, de praderas y áreas forestales en terrenos de cultivo y pastoriles; lo cual ha ocasionado pérdidas históricas del C del suelo. En este sentido, la promoción de prácticas (p. ej., la conservación del suelos) y condiciones (p. ej., la rehabilitación de suelos degradados) para que los suelos agrícolas

sean sumideros de C, tendría efectos positivos, no solo en la producción de alimentos, sino en el ambiente y en la protección de la biodiversidad.

Investigaciones efectuadas en los Llanos Orientales de Colombia, en la década de los años noventa, sugirieron que la acumulación de C en suelos manejados con pastos mejorados podría ser sustancial (Fisher et al., 1994). En este contexto, Colombia y Brasil han realizado esfuerzos en la recuperación de pastos degradados en sus planes de acción para la mitigación del cambio climático a nivel regional y nacional. Sin embargo, aún no hay consenso en la literatura científica sobre el uso potencial de pastos mejorados como medida para capturar C en el suelo. La respuesta a esta pregunta, con base en la observación científica, debería tener implicaciones sobre las políticas y programas del país para apoyar el mejoramiento de la productividad agrícola y ganadera. Al tiempo, se mitigarían las emisiones de GEI por estos sectores.

Herramientas de muestreo

Muestras disturbadas para C en el suelo

Marco de 1 m x 1 m

Barreno cilíndrico de 1 m x 2,54 cm (1 pulgada) de diámetro interno

Boquilla para barreno

Tubos de acrílico (plástico) de 1 m x 2,54 cm (1 pulgada) de diámetro externo

Maceta de 16 libras

6 baldes de plástico

Bolsas plásticas con capacidad de 500 g

Rótulos para identificación de las muestras

Gato cremallera

Templadora de alambre

Cuerda

Muestras no disturbadas para densidad aparente

Palas y palines

Cinta métrica

Anillos de muestreo (5 cm de altura x 5 cm de diámetro)

Tapas de anillos

Muestreador de anillos

Espátula y palas de jardín

① → ② → ③ → Procedimiento

Toma de muestra disturbada

De acuerdo con el objetivo del estudio, se selecciona el sitio de muestreo y la ubicación de las submuestras (repeticiones) a ser tomadas. En los sitios seleccionados, se ubica un marco de muestreo de 1 m² (1x1 m), como referencia para tomar cinco muestras de suelo (en los cuatro vértices y en el medio). En el barreno cilíndrico (tubo de muestreo), se introduce el tubo de acrílico de 1 m, el cual es asegurado con la boquilla. Para tomar cada muestra, el barreno es introducido de forma manual con la ayuda de una maceta de 16 libras, hasta llegar a la profundidad determinada (1 m). El barreno es extraído del suelo usando un gato mecánico tipo cremallera; el tubo de acrílico es removido del barreno para separar, de la columna de suelo, las seis profundidades definidas (0-5, 5-10, 10-20, 20-40, 40-60 y 60-100 cm). Las cinco submuestras de cada profundidad son colocadas en recipientes plásticos debidamente identificados y se mezclan para obtener una muestra homogénea de la cual se tomará una submuestra para analizar su contenido de C.

A continuación, se observan fotografías de esta secuencia de muestreo:



(a) Selección del lote; (b) identificación de tres sitios de muestreo equidistantes dentro del lote seleccionado.



(c) Ubicación del marco de muestreo de 1 m² (1x1 m) e introducción del tubo en el suelo; (d) extracción del tubo con muestra de 1 m de profundidad.



(e) Separación de submuestras del tubo por profundidad predefinida; (f) colocación y homogenización de las muestras de los cinco puntos de muestreo de cada marco separadas por profundidad.

Toma de muestras no disturbada para densidad aparente

En el sitio (repetición) central de muestreo (de los tres identificados para cada lote), se abre una calicata de 1 m³ para la toma de muestras. Esto con el fin de estimar la densidad aparente a las mismas profundidades de muestreo definidas para determinar el contenido de C.

Las muestras se toman utilizando los cilindros de 5 cm de alto x 5 cm de diámetro; sin disturbar, en lo posible, la muestra durante todo el proceso de extracción.



Identificación de las muestras y envío al laboratorio

Todas las muestras son identificadas según la finca, el tipo de pradera (uso de la tierra), la profundidad y repetición. Con esa finalidad, se asigna un código y un número consecutivo. Los listados correspondientes son preparados y adjuntados a las muestras para su envío a los laboratorios donde se realizarán los análisis predefinidos.



Referencias

- Balesdent J; Arrouays D. 1999. Usage des terres et stockage du carbone dans les sols du territoire français (1900–1999) C. R. Acad. Agric. Fr 85 (6): 265-277.
- Cambardella C. 1998. Experimental verification of simulated soil organic matter pools. En: Lai L; Kimble JM; Follett RA; Stewart BA. Eds. Soil processes and the Carbon Cycle. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Fisher MJ; Rao IM; Ayarza MA; Lascano CE; Sanz JI; Thomas RJ; Vera RR. 1994. Carbon storage by introduced deep-rooted grasses in the South American savannas. Nature (London), 371:236–238.
- Gragorich EG; Drury CF; Ellert BH; Liang BC. 1996. Fertilization effects on physically protected light fraction organic matter. Soil Sci Soc Am J 60:472–476.
- Houghton RA. 1999. The annual net flux of carbon to the atmosphere from changes in land use 1850–1990. Tellus 51B:298–313.
- IPCC. Ed. 2001. Tercer Informe de Evaluación del Cambio Climático. 2001. Impactos, adaptación y vulnerabilidad. Resumen para responsables de políticas y resumen técnico. Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). OMM, PNUMA.
- Lai R; Kimble JM; Follett RF; Cole CV. 1998. The potential of US cropland to sequester carbon and mitigate the green house effect. Chelsea, Michigan, USA: Ann Arbor Press.
- Smith P; Martino D; Cai Z; Gwary D; Janzen H; Kumar P; McCarl B; Ogle S; O'Mara F; Rice C; Scholes B; Sirotenko O; Howden M; McAllister T; Pan G; Romanenkov V; Schneider U; Towprayoon S; Wattenbach M; Smith J. 2008. Greenhouse Gas Mitigation in Agriculture. Phil. Trans. R. Soc. B. 363:789.
- Trumbore SE; Davidson EA; Barbosa de Camargo P; Nepstad DD; Martinelli LA. 1995. Belowground cycling of carbon in forest and pastures of eastern Amazonia. Global Biogeochemical Cycles 9:515–528.

CONTACTOS

Paola Pardo Saray

p.a.pardo@cgjar.org

Jacobo Arango

j.arango@cgjar.org

Aracely Castro

aczii69@gmail.com

Determinación de carbono en suelos (Walkley & Black)

Introducción

El carbono orgánico (CO) del suelo se relaciona con la sustentabilidad de los sistemas agrícolas al afectar las propiedades del suelo relacionadas con el rendimiento sostenido de los cultivos.

Además, está asociado con la cantidad y disponibilidad de nutrientes del suelo dado que aporta elementos como el N, cuya contribución mineral es normalmente deficitaria. A su vez, al modificar la acidez y la alcalinidad hacia valores cercanos a la neutralidad, el CO aumenta la solubilidad de varios nutrientes.

Asimismo, este proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico cuando está asociado a la materia orgánica (MO). De este modo, su efecto en las propiedades físicas se manifiesta mediante la modificación de la estructura y la distribución del espacio poroso del suelo.

La cantidad de CO no solo depende de las condiciones ambientales locales sino, en gran medida, del manejo del suelo. Si bien, existen prácticas de manejo que generan un detrimento del CO con el paso del tiempo; también, hay prácticas que favorecen su acumulación.

En cuanto al estado del carbono en los suelos, este puede encontrarse en forma orgánica e inorgánica. El carbono orgánico del suelo se halla en residuos orgánicos poco alterados de vegetales, animales y microorganismos; en el humus y en formas muy condensadas de composición próxima al C elemental (Jackson, 1964).

En condiciones naturales, el CO del suelo resulta del balance entre la incorporación del material orgánico fresco y la salida de C del suelo en CO₂

hacia la atmósfera. Al igual que por erosión y lixiviación (Aguilera, 2000; Swift, 2001).

Cuando los suelos tienen condiciones aeróbicas, una parte importante del carbono que ingresa al suelo es lábil y se mineraliza rápidamente. Entonces, una pequeña fracción se acumula como humus estable (FAO, 2001). El CO₂ emitido desde el suelo a la atmósfera no solo se produce por la mineralización de la MO donde participa la fauna edáfica (organismos detritívoros) y los microorganismos del suelo sino, además, se genera por el metabolismo de las raíces de las plantas (Fortín et al., 1996).

La MO puede ser protegida de descomposición acelerada mediante: 1) la estabilización física por la microagregación, 2) la estabilización fisicoquímica mediante asociación con partículas de arcilla, y 3) la estabilización bioquímica por medio de la formación de compuestos altamente recalcitrantes (Six et al., 2002).

Es difícil cuantificar con precisión la cantidad de MO en el suelo; no obstante, se puede medir el contenido de CO y estimar la MO con un factor de conversión basado en el % de CO en la MO. Se asume que la MO contiene el 58% de CO y se usa el factor de Van Bemmelen de 1,72 para estimar la MO. Mas, en realidad este factor es muy variable entre diferentes suelos; por lo tanto, se recomienda trabajar con el valor de CO y no con MO.

Se puede medir el CO de tres maneras:

1. Por diferencia entre C total y C inorgánico (Ct-Ci).
2. Midiendo el Ct después de que se elimine el Ci.
3. Por oxidación con dicromato.

Principio

No existe un método de rutina con el cual se pueda determinar la materia orgánica (MO) en el suelo de una manera satisfactoria. Por esta razón, se aplica un método indirecto a partir de la medida del contenido de carbono orgánico: el procedimiento modificado de Walkley y Black (1934).

Este método determina el carbono orgánico oxidable (sin digestión); Sin embargo, la oxidación no es completa. En promedio, se oxida el 76% del carbono total, el cual se establece por espectrofotometría.

Es un método de oxidación húmeda con dicromato de potasio (oxidante) en medio ácido (sulfúrico) concentrado. El calor aquí generado produce la siguiente reacción:



Ácido sulfúrico: su concentración no debe ser menor de 96% p/p. Esto debido a que dentro del rango del 90 al 99% existe un incremento casi lineal de recuperación del CO del 1% por cada % de aumento en la concentración del ácido (Walkley, 1947).

El potencial redox del sistema está fuertemente asociado a la concentración de H_2SO_4 y a la temperatura de reacción. Por lo tanto, un aumento en la concentración del ácido incrementaría la fuerza oxidante del sistema, pero reduciría la temperatura alcanzada en la disolución.

Por otra parte, la concentración de dicromato, empleada en la mezcla, debe asegurar una intensidad oxidativa constante; por lo que la muestra no debería consumir más del 80% del dicromato añadido (Walkley, 1947).

El ácido crómico producido se determina colorimétricamente a 620 nm.



Equipo

- Material de laboratorio (vidriería para preparación de soluciones)
- Erlenmeyers de 250 y/o 125 ml
- Balanza
- Dispensador
- Espectrofotómetro



Reactivos

- Ácido sulfúrico p.a. 96% H_2SO_4
- Glucosa grado reactivo 95% $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- Dicromato de potasio 99,9% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- Agua bidestilada y desionizada



Preparación de soluciones

Solución patrón de 10.000 mg/L (ppm)

En un balón volumétrico de 100 ml (o 50 ml), pese 2,63 g (o 1,315 g) de glucosa (anhidra y al 95%) y disuelva en agua bidestilada hasta completar el volumen. Esta solución es estable por una semana.

Solución dicromato de potasio al 8%

Para 1 litro de solución, pese 80 g del reactivo y complete a volumen con agua desionizada.

Estándares de trabajo

Tome de la solución de 10 000 ppm las alícuotas indicadas en balones de 100 ml. Agregue a cada balón 5 ml de dicromato de potasio al 8% y 10 ml de H_2SO_4 (en el Laboratorio del CIAT, se usa la marca Odal). Complete cuando esté frío con agua desionizada.

Balones de 100 ml

Alicuota	Solución	C Oxidable (CO)	% C	C Total	MO
ml	ppm C (mg/ L)	0,5 g suelo (ppm * 0,2)	CO / 10	CO * Factor 1,32	Ct * Factor 1,72
0	0	0	0	0	0
0,5	50	10	1	13,2	22,7
1	100	20	2	26,4	45,4
1,5	150	30	3	39,6	68,11
2	200	40	4	52,8	90,816

Se realizó la siguiente modificación para agilizar cuando se tienen muchas muestras para análisis

Tome de la solución de 10.000 ppm las alícuotas indicadas en balones de 50 ml. Agregue a cada balón 2,5 ml de dicromato de potasio al 8% y 5 ml de H₂SO₄ (en el Laboratorio del CIAT, se usa la marca Odal). Complete cuando esté frío con agua desionizada.

Balones de 50 ml

Alicuota	Solución	C Oxidable (CO)	% C	C Total	MO
ml	ppm C (mg/ L)	0,25 g suelo (ppm * 0,2)	CO / 10	CO * Factor 1,32	Ct * Factor 1,72
0	0	0	0	0	0
0,25	50	10	1	13,2	22,7
0,5	100	20	2	26,4	45,4
0,75	150	30	3	39,6	68,11
1	200	40	4	52,8	90,816

① → ② → ③ → Procedimiento

Extracción

1. Pese 0,5 o (0,25 g) de suelo seco en erlenmeyer de 250 ml (125 ml). Si es oscuro, pese menos [(0,250 o 0,125 g si está usando 0,5 g) (0,125 o 0,0625 si se está trabajando con 0,25 g)].
2. Con transferpipeta, agregue 5 ml (2,5) de solución de dicromato de potasio al 8% y agite bien la disolución.
3. Agregue 10 ml (5 ml) de ácido sulfúrico 96% (Odal) y agite hasta alcanzar una completa disolución. Tenga cuidado con la generación de calor.
4. Deje enfriar completamente (mínimo 2 horas).
5. Adicione 85 ml (42,5 ml) de agua desionizada, agite bien las muestras y deje en reposo durante la noche.
6. Trasvase la solución sobrenadante a tubos de ensayo para su lectura. Evite disturbar la muestra.
7. Traslade cuidadosamente con transferpipeta 250 μ l de cada muestra a cada pozo del plato (placa multipozos), tratando de adicionar la misma cantidad cada vez e identificando muy bien las muestras o lea directamente en el Gilford.
8. Calibre el espectrofotómetro de UV-VIS con los patrones (curva) a una longitud de onda de 620 nm usando concentración o absorbancia.

9. En el Laboratorio del CIAT, se realiza en un equipo *Synergy* HT (*BioTek* Co.) usando placas multilectura o en el *Gilford* por succión. Lea las muestras y calcule la concentración de carbono en las muestras en g.kg^{-1} de suelo.



Resultados

Carbono oxidable (CO) en suelo en g.kg^{-1} datos en ppm a partir de la curva.

Si se usa 0,5 g de suelo y V = 100 ml

$$\text{g / kg CO en suelo} = [\text{mg} / 1000 \text{ ml}] * (100 \text{ ml} / 0,5) * (1000 \text{ g} / 1 \text{ kg}) * (1 \text{ g} / 1000 \text{ mg}) = 0,2 \text{ (factor)}$$

$$\text{Si se pesa } 0,25 \text{ g} \rightarrow \text{Factor} = 0,4$$

$$\text{Si se pesa } 0,125 \text{ g} \rightarrow \text{Factor} = 0,8$$

Entonces:

$$\text{mg. l}^{-1} * 0,2 = \text{g. kg}^{-1} \text{ C (carbono oxidable CO)}$$

Para pasar de g. kg^{-1} C a % de C se divide por 10

$$\rightarrow \% \text{ C} = (\text{g. kg}^{-1} / 10)$$

Para reportar el resultado como carbono total (Ct):

Como la oxidación no es completa (solo el 76%)

$$\text{g.kg}^{-1} \text{ C} * 76\% (100/76) \rightarrow \text{g.kg}^{-1} \text{ C} * 1,32 \text{ (Ct)}$$

Se asume que la materia orgánica contiene 58% de carbono orgánico.

$$58\% = (100/58) = 1,72 \text{ Factor de Bemmelen}$$

$$\rightarrow \text{materia orgánica (MO)} = \text{Ct} * 1,72 = \text{g.kg}^{-1} \text{ MO}$$

Para reportar el resultado como % de materia orgánica (MO): = $(\text{g.kg}^{-1} \text{ MO} / 10)$

Si se usa 0,25 g de suelo y V= 50 ml

$$\text{g/kg C oxidable en suelo} = (\text{mg}/1000 \text{ ml}) \text{ C solución} * 50 \text{ ml}/0,25 * 1000 \text{ g}/1 \text{ kg} * 1 \text{ g}/1000 \text{ mg}$$

$$\text{g/kg C oxidable en suelo} = \text{mg/L C en solución} * 0,2 \text{ (factor)}$$

$$\text{Si se pesa } 0,125 \text{ g} \rightarrow \text{Factor} = 0,4$$

$$\text{Si se pesa } 0,0625 \text{ g} \rightarrow \text{Factor} = 0,8$$

Entonces:

$$\text{mg.l}^{-1} * 0,2 = \text{g.kg}^{-1} \text{ C (carbono oxidable) carbono orgánico oxidable}$$

Para pasar de g.kg^{-1} C a % de C se divide por 10

$$\rightarrow \% \text{ C} = (\text{g.kg}^{-1} / 10)$$

Para reportar el resultado como carbono orgánico total (Ct):

Como la oxidación no es completa (solo el 76%)

$$\text{g.kg}^{-1}\text{C} * 76\% (100/76) \rightarrow \text{g.kg}^{-1} \text{C} * 1,32 (\text{Ct})$$

Se asume que la materia orgánica contiene 58% de carbono orgánico.

$$58\% = (100/58) = 1,72 \quad \text{Factor de Bemmelen}$$

$$\rightarrow \text{Materia orgánica (MO)} = \text{Ct} * 1,72 = \text{g.kg}^{-1} \text{MO}$$

Para reportar el resultado como % de materia orgánica (MO): = $(\text{g.kg}^{-1} \text{MO} / 10)$.

Nota:

Esta metodología es aplicada en los Laboratorios de Química de Suelos y de Nutrición y Fisiología de Plantas del CIAT. A continuación, se enuncia parte de la bibliografía citada y consultada.

Referencias

- Aguilera SM. 2000. Importancia de la protección de la materia orgánica en suelos. Simposio Proyecto Ley Protección de Suelo. Boletín No. 14. Valdivia, Chile.
- Benton-Jones Laboratories. s.f. Plant Analysis Techniques. Georgia, USA.
- CIAT. 2013. Manual de métodos de análisis del Laboratorio de Servicios Analíticos del CIAT. Cali, Colombia. CIAT.
- FAO. 2001. Soil Carbon sequestration for improved land management. World soil reports 96. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy: FAO.
- Fisher MJ; Rao IM; Ayarza MA; Lascano CE; Sanz JI; Thomas RJ; Vera RR. 1994. Carbon storage by introduced deep rooted grasses in the South American savannas. *Nature (London)* 371:236-238.
- Fortin MC; Rochette P; Pattey E. 1996. Soil carbon dioxide fluxes from conventional and no-tillage smallgrain cropping system. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60:1541-1547.
- Jackson ML. 1964. Análisis químico de suelos. Barcelona, España: Ediciones Omega, S. A.
- McKean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Mebius LJ. 1960. A rapid method for the determination of organic carbon in soils. *Anal Chim Acta* 22:120-124.
- Mosquera O. s.f. Metodología Laboratorio Servicios Analíticos CIAT. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Page AL. Ed. 1982. Methods of Soil Analysis part 2. Chemical and microbiological properties. Wisconsin, USA: American Society of Agronomy.
- Salinas JG; García R. 1985. Métodos químicos para análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Sims JR; Haby VA. 1971. Simplified Colorimetric Determination of Soil Organic Matter. *Soil Sci.* 112:137-141.
- Six J; Conant RT; Paul EA; Paustian K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241:155-176.
- Swift RS. 2001. Sequestration of carbon by soil. *Soil Sci* 166:858-871.
- Walkley A. 1947. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils. Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63:251-264.
- Walkley A; Black IA. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37:29-38.

CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de carbono en suelos (Walkley & Black) con calentamiento

Introducción

El carbono orgánico (CO) del suelo se relaciona con la sustentabilidad de los sistemas agrícolas y afecta las propiedades del suelo relacionadas con el rendimiento sostenido de los cultivos.

Se vincula con la cantidad y disponibilidad de nutrientes del suelo, al aportar elementos como el N, cuya contribución mineral es normalmente deficitaria. Además, al modificar la acidez y la alcalinidad hacia valores cercanos a la neutralidad, el CO aumenta la solubilidad de varios nutrientes.

Cuando está asociado a la materia orgánica (MO) del suelo, este proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico. Su efecto en las propiedades físicas se manifiesta en la modificación de la estructura y la distribución del espacio poroso del suelo.

La cantidad de CO no solo depende de las condiciones ambientales locales, también es afectada por el manejo del suelo. Si bien hay prácticas de manejo que generan un detrimento del CO en el tiempo, existen otras que favorecen su acumulación.

En cuanto al carbono en los suelos, este puede encontrarse en forma orgánica e inorgánica (Jackson, 1964). El C orgánico (CO) se encuentra en los residuos orgánicos poco alterados (vegetales, animales y microorganismos), en el humus o en formas muy condensadas de composición próxima al C elemental (Jackson, 1964).

En condiciones naturales, el CO del suelo resulta del balance entre la incorporación del material orgánico fresco y la salida de C por erosión, lixiviación o en forma de CO₂ a la atmósfera (Aguilera, 2000; Swift, 2001).

Cuando los suelos presentan condiciones aeróbicas, una buena parte del carbono que ingresa al suelo es lábil y se mineraliza rápidamente; otra fracción pequeña se acumula como humus estable (FAO, 2001). El CO₂ emitido desde el suelo a la atmósfera no solo se produce por la mineralización de la MO donde participa la fauna edáfica (organismos detritívoros) y los microorganismos del suelo; sino que también se genera por el metabolismo de las raíces de las plantas (Fortín et al., 1996).

La MO puede ser protegida de descomposición acelerada mediante: 1) estabilización física por la microagregación, 2) estabilización fisicoquímica mediante asociación con partículas de arcilla, y 3) estabilización bioquímica mediante la formación de compuestos altamente recalcitrantes (Six et al., 2002).

Es difícil cuantificar, con precisión, la cantidad de MO en el suelo, pero se puede medir el contenido de CO y estimar la MO con un factor de conversión basado en el % de CO en la MO. Se asume que la MO contiene el 58% de CO y se usa el factor de Van Bemmelen de 1,72 para estimar la MO. En realidad, este factor es muy variable entre diferentes suelos; por lo tanto, se recomienda trabajar con el valor de CO y no con MO.

Principio

No existe un método de rutina con el cual se pueda determinar la materia orgánica (MO) en el suelo de una manera satisfactoria. Por esta razón, se utiliza un método indirecto a partir de la medida del contenido de carbono orgánico. Este es el procedimiento modificado de Walkley y Black (1934).

Este método determina el carbono orgánico oxidable (sin digestión). Sin embargo, la oxidación no es completa; se estima que en promedio se oxida el 76% del carbono total, el cual se determina por espectrofotometría.

Es un método de oxidación húmeda con dicromato de potasio (oxidante) en medio ácido (sulfúrico) concentrado. El calor aquí generado produce la siguiente reacción:



Ácido sulfúrico: su concentración no debe ser menor de 96% p/p. Esto debido a que dentro del rango del 90 al 99% existe un incremento casi lineal de recuperación del CO del 1% por cada % de aumento en la concentración del ácido (Walkley, 1947).

El potencial redox del sistema está fuertemente asociado a la concentración de H_2SO_4 y a la temperatura de reacción. Por lo tanto, un aumento en la concentración del ácido incrementaría la fuerza oxidante del sistema, pero reduciría la temperatura alcanzada en la disolución.

Por otra parte, la concentración de dicromato empleada en la mezcla debe asegurar una intensidad oxidativa constante, por lo que la muestra no debería consumir más del 80% del dicromato añadido (Walkley, 1947).

El ácido crómico producido se determina colorimétricamente a 620 nm.

En este método de Walkley y Black, la oxidación no es completa. Ellos estimaron que, en promedio, un 76% se oxida y, en consecuencia, sugirieron un factor de conversión de 1,32 (100/76) para calcular el contenido de carbono orgánico total en el suelo.

Por su parte, Mebius (1960) modificó el método e introdujo una fuente de calor externa (digestión) para generar una oxidación completa. De esta manera, no tiene que aplicarse el factor de conversión al carbono orgánico total (1,32).

Así, luego de la oxidación con calor, se puede determinar el carbono orgánico total por colorimetría. El ácido crómico producido durante la oxidación se lee a 620 nm usando patrones de glucosa.



Equipo

- Material de laboratorio (vidriería)
- Tubos Taylor de digestión aforados a 50 ml
- Balanza
- Dispensador
- Plancha de digestión
- Espectrofotómetro



Reactivos

- Ácido sulfúrico p.a. 96% H_2SO_4
- Glucosa grado reactivo 95% $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- Dicromato de potasio 99,9% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- Agua bidestilada y desionizada



Preparación de soluciones

Solución patrón de 10.000 mg/l (ppm)

En un balón volumétrico de 100 ml (50 ml), pese 2,63 g (1,315 g) de glucosa (anhidra y al 95%) y disuélvala en agua bidestilada. Complete hasta el volumen. Esta solución es estable por una semana.

Solución dicromato de potasio al 8%

Para 1 litro de solución, pese 80 g del reactivo y complete el volumen con agua desionizada.

Estándares de trabajo

Tome de la solución de 10.000 ppm las alícuotas indicadas, en balones de 50 ml. Agregue a cada balón 2,5 ml de dicromato de potasio al 8% y 5 ml de H₂SO₄ (en el Laboratorio del CIAT, se usa la marca Odal). Complete el volumen, cuando esté frío, con agua desionizada. Agite.

Balones de 50 ml

Alicuota	Solución	CC Total	% C	MO	MO
ml	ppm C (mg/ L)	0,25 g suelo (ppm * 0,2)	CO / 10	CO * Factor 1,72	Ct * Factor 1,72
0	0	0	0	0	0
0,25	50	10	1	17,2	1,72
0,5	100	20	2	34,4	3,44
0,75	150	30	3	51,6	5,16
1	200	40	4	68,8	6,88

① → ② → ③ → Procedimiento

1. Pese 0,25 g de suelo seco y cernido con un tamiz de 1 mm en tubos de digestión (Taylor) aforados a 50 ml. Si es oscuro y con raíces, pese solo 0,125 g. Realice el mismo paso con los suelos control (0,25 g).
2. Con transferpipeta o dispensador agregue 2,5 ml de solución dicromato de potasio al 8% a cada muestra. Agite bien la disolución.
3. Lentamente, agregue 5 ml de ácido sulfúrico a cada muestra. Se generará calor, agite con cuidado.
4. Coloque los tubos en el digestor a 120 °C durante 2 h.
5. Baje los tubos y deje enfriar completamente (al menos 1 hora)
6. Complete con agua desionizada hasta un volumen final de 50 ml. Agite bien las muestras y deje en reposo durante la noche o al menos medio día.
7. Con mucho cuidado, tome una alícuota de 250 µl de la solución sobrenadante y viértala en los pozos de las placas para su lectura. Evite disturbar la muestra y trate de adicionar la misma cantidad cada vez; identifíquelas muy bien. Si las lee en el *Gilford*, lo debe hacer directamente en el tubo sin disturbar la muestra.
8. Calibre el espectrofotómetro de UV-VIS con los patrones (curva) a una longitud de onda de 620 nm usando concentración o absorbancia.
9. En el Laboratorio del CIAT, es en un equipo *Synergy* HT (*BioTek* Co.) haciendo uso de placas multilectura o en el *Gilford* por succión. Lea las muestras y calcule la concentración de carbono en g.kg⁻¹ de suelo.



Resultados

0,25 g de suelo y $V = 50$ ml

$\text{g/kg C oxidable en suelo} = (\text{mg}/1000 \text{ ml}) \text{ C solución} * 50 \text{ ml}/0,25 * 1000 \text{ g}/1 \text{ kg} * 1 \text{ g}/1000 \text{ mg}$

$\text{g/kg C oxidable en suelo} = \text{mg/l C en solución} * 0,2$ (factor)

Si se pesa 0,125 g → Factor = 0,4

Cálculos

Entonces: $\text{mg.l}^{-1} * 0,2 = \text{g.kg}^{-1} \text{ C (carbono orgánico total) COt}$

Para pasar de $\text{g.kg}^{-1} \text{ C}$ a % de C, se divide por 10 → $\% \text{ C} = (\text{g.kg}^{-1} / 10)$

Se asume que la materia orgánica contiene 58% de carbono orgánico

$58\% = (100/58) = 1,72$ Factor de Bemmelen

→ $\text{Materia orgánica (MO)} = \text{COt} * 1,72 = \text{g.kg}^{-1} \text{ MO}$

Para reportar el resultado como % de materia orgánica $(\text{MO}) = (\text{g.kg}^{-1} \text{ MO} / 10)$



Referencias

- Aguilera SM. 2000. Importancia de la protección de la materia orgánica en suelos. Simposio Proyecto Ley de Protección de Suelo. Boletín No 14. Valdivia, Chile.
- Benton-Jones Laboratories. s.f. Plant Analysis Techniques. Georgia, USA.
- FAO. 2001. Soil carbon sequestration for improved land management. World soil reports. Food and 86.
- Fisher MJ; Rao IM; Ayarza MA; Lascano CE; Sanz JI; Thomas RJ; Vera RR. 1994. Carbon Storage by Introduced Deep Rooted Grasses in the South American Savannas. Nature (London) 371:236-238.
- Fortin MC; Rochette P; Pattey E. 1996. Soil carbon dioxide flux from conventional and no-tillage small grain cropping systems. Soil Sci. Soc. Am. J. 60:1541-1547.
- Jackson ML. 1964. Análisis químico de suelos. Ediciones Omega. S. A.
- Mckean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Mebius LJ. 1960. A rapid method for the determination of organic carbon in soils. Anal Chim Acta 22:120-124.
- Mosquera O. s.f. Metodología Laboratorio Servicios Analíticos CIAT. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Page AL. Ed. 1982. Methods of soil analysis Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. Wisconsin, USA.
- Salinas JG; García R. 1985. Métodos químicos para análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Sims JR; Haby VA. 1971. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. Soil Sci. 112:137-141.

Six J; Connat RT; Paul EA; Paustian K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241:115-176.

Swift RS. 2001. Sequestration of carbon by soil. *Soil Sci.* 166:858-871.

Walkley A. 1947. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63:251-264.

Walkley A; Black IA. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37:29-38.

 CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de aluminio (Al) (acidez intercambiable)

Introducción

El aluminio (Al) es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre. Generalmente, se encuentra en forma de aluminosilicatos y se solubiliza conforme el pH del suelo disminuye. La toxicidad del Al ha sido reconocida como el factor limitante más relevante para la producción agrícola en suelos ácidos. El síntoma principal de la toxicidad por Al es la inhibición del crecimiento de las raíces.

La toxicidad del Al ha sido asociada a una reducción de la absorción de varios nutrientes de las plantas. Se ha señalado que produce precipitación de los fosfatos en el interior de la pared celular. Asimismo, se ha observado que un exceso de Al interfiere en la división celular en las raíces; así como el proceso de absorción y utilización de algunos iones, en especial el Ca, Mg y P.

Por lo general, el suelo es la fuente que suministra los nutrientes a la planta. No obstante, la cantidad

total presente de cada nutriente no establece, por sí sola, su disponibilidad en el organismo vegetal. Sobre esta influyen diversos factores, entre ellos, el pH y la provisión de oxígeno del suelo. Estos últimos pueden modificar la solubilidad o la forma química en que se encuentra un elemento.

Así, un pH neutro o poco ácido, entre 5 y 7, favorecerá la disponibilidad de la mayoría de los nutrientes. Valores altos harán menos disponible algunos nutrientes, entre ellos el P. Un pH muy bajo puede insolubilizar algunos nutrientes y movilizar al aluminio (Al^{+3}).

El catión Al es soluble a pH ácido. En estas condiciones, inhibe el crecimiento de muchas especies al impedir la absorción de Fe y algunos procesos metabólicos.

Para aclarar un poco el concepto de acidez en suelos, a continuación se presentan algunas definiciones.

Clasificación de la acidez

Acidez activa: es la abundancia de H^+ en la solución del suelo. Se mide por el pH del suelo.

Acidez intercambiable: corresponde a la suma de H^+ y Al^{+3} en posiciones de intercambio al pH del suelo. Se mide en meq/100 g o cmolc/kg.

Acidez no intercambiable: se refiere a las cargas que se disocian al aumentar el pH.

Acidez titulable: es la concierne a la cantidad de base fuerte requerida para llevar el pH del suelo a un valor determinado (p. ej., pH 7). Se mide en meq/100 g o cmolc/kg.

La suma de la acidez intercambiable y la no intercambiable atañe a la acidez titulable.

$$\text{Acidez intercambiable} + \text{acidez no intercambiable} = \text{acidez titulable}$$

Además, existe una clasificación que denomina factor intensidad de la acidez, a la presencia de H^+ en la solución, la cual se mide a través del pH.

A su vez, se considera factor de capacidad a la reserva de acidez y se mide a través de la titulación.

Principio

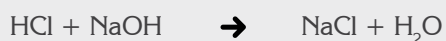
La acidez intercambiable de un suelo (suelos ácidos pH < 5,5) es una estimación de la cantidad de hidrógeno (H⁺) y aluminio (Al⁺³) intercambiable en el suelo.

Los iones de H⁺ y Al⁺³ se extraen del suelo con una solución neutra de KCl. Se realiza un intercambio catiónico de la fase sólida del suelo con la solución, así se obtiene HCl libre y la sal fácilmente hidrolizable AlCl₃.

Por efecto del agua, el AlCl₃ se hidroliza y, por consiguiente, se aumenta la cantidad de HCl.



La acidez del extracto se determina por titulación con NaOH y con fenolftaleína como indicador.



Para estimar el Al intercambiable se vuelve a titular con ácido clorhídrico (HCl). La diferencia, entre los dos, indica el H intercambiable en el suelo.

Equipo

- Material de laboratorio (vidriería)
- Balanza
- Agitador
- Papel filtro
- Bureta
- Espectrofotómetro de absorción atómica

Reactivos

- Cloruro de potasio 99,5% KCl
- Hidróxido de sodio 99% NaOH
- Fluoruro de sodio 99% NaF
- Ácido clorhídrico 37% HCl
- Fenolftaleína (indicador)
- Agua destilada, bidestilada y desionizada

Preparación de soluciones

Cloruro de potasio (KCl 1 M)

Pese 74,55 g de KCl por 1 litro (usar agua bidestilada).

Hidróxido de sodio (NaOH 0,05 M)

Pese 2 gr de NaOH y complete hasta un volumen de 1 litro con agua bidestilada.

Ácido clorhídrico 0,01 N

Mida 0,828 ml de HCl y complete hasta un volumen final de 1 litro con agua desionizada.

Ácido clorhídrico 0,05 N

Mida 4,14 ml de HCl y complete hasta un volumen final de 1 litro con agua desionizada.

Solución de fluoruro de sodio 1 M

Pese 40 g de NAF y enrase hasta un volumen de 1 litro con agua desionizada. Prepare cada vez que vaya a realizar la determinación.

Fenolftaleína 1% en alcohol

Pese 1 g de fenolftaleína y disuélvala en 70 ml de alcohol etílico. Luego, complete al volumen (100 ml) con alcohol.

Metil Naranja 0,1%

Pese 0,1 g en y disuélvalo en un balón con 100 ml de agua desionizada.

①→②→③→ Procedimiento

1. Pese 5 g de suelo en Erlenmeyer de 125 ml.
2. Agregue 25 ml de solución extractora (KCl 1 M).
3. Agite 5 min.
4. Filtre por gravedad en balones de 100 ml a medida que lava el suelo con 5 porciones de 5 ml de KCl.
5. Verifique el volumen (50 ml) con KCl 1 M y agite hasta homogenizar.
6. Para Ca y Mg, tome 2 ml de la muestra y adicione 18 ml de óxido de lantano (se puede reducir a la mitad: 1 ml de muestra y 9 ml de La_2O_2).
7. Cuando ya está listo el extracto, determine el Ca y Mg por absorción atómica.
8. Una vez leídos estos cationes, pase a determinar el Al por medio de una titulación o directamente, si no se pide, el Ca y el Mg.

Acidez intercambiable (Al y H)

1. Transfiera 50 ml o el volumen restante (si se ha extraído para leer el Ca y el Mg, tenga en cuenta este volumen para los cálculos) del extracto obtenido con KCl 1 M a un erlenmeyer de 125 ml.
2. Agregue 2-3 gotas de fenolftaleína y titule con solución NaOH 0,05 M hasta la aparición de un color rosado pálido permanente.
3. Anote los ml de NaOH gastados en la titulación.

Si se requiere Al intercambiable

4. Después de la titulación anterior, agregue 1 gota de HCl 0,01M para que el color rosado desaparezca.
5. Agregue 10 ml de fluoruro de sodio (NaF) 1 M.
6. Titule con solución HCl 0,05 hasta que el color desaparezca otra vez por más de 1 minuto.

Para estimar directamente el hidrógeno intercambiable

1. Transfiera 50 ml del extracto KCl a un erlenmeyer de 125 ml.
2. Agregue 2-3 gotas de indicador metil naranja 0,1%.
3. Titule con NaOH 0,05 M hasta la aparición de un color amarillo permanente.
4. Anote los ml de NaOH gastados en la titulación, los cuales son equivalentes a los meq de H intercambiable por 100 g de suelo.



Resultados

Acidez intercambiable

$\text{meq Al}^{+3}/100 \text{ g suelo} = V.\text{NaOH} \times N.\text{NaOH} \times V \text{ de sol. extractante} \times 100/\text{alícuota} \times \text{peso de la muestra de suelo.}$

$$= \text{ml NaOH} * 0,05 * 100/50 * 100/10$$

$$\text{Al}^{+3} \text{ meq.} 100^{-1} \text{g suelo} = \text{ml NaOH} * 1$$

Los resultados son enviados por servicios analíticos en cmol.kg^{-1} que equivalen a $\text{meq} 100^{-1} \text{ g suelo}$

Aluminio intercambiable

$$\text{Al}^{+3} \text{ meq.} 100^{-1} \text{g suelo} = \text{ml HCl} * N \text{ HCl} * \text{vol. extracto/vol. alícuota} * 100/\text{peso muestra}$$

$$= \text{ml HCl} * 0,05 * 100/50 * 100/10$$

$$= \text{ml HCl} * 1$$

Hidrógeno intercambiable = meq de acidez intercambiable – meq de Al intercambiable

Otros cálculos: capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE)

En suelos con carga variable, los cationes intercambiables (incluso el Al) se desplazan con una sal no amortiguada. La CICE se toma como la suma de los cationes en el extracto.

Se expresan en $\text{meq } 100^{-1}$ de suelo y se usan los resultados obtenidos para Ca y Mg.

$$\text{CICE} = \text{Ca} + \text{Mg} + \text{K} + \text{Al}$$

Porcentaje de saturación de Al

Es la otra medida de la acidez del suelo y expresa el porcentaje de la saturación de Al de la CICE. Esta estimación se usa como una indicación de la química y fertilidad potencial del suelo.

$$\% \text{ saturación Al} = (\text{Al} / \text{CICE}) * 100$$

Nota:

Esta metodología corresponde a la adaptada en el Laboratorio de Servicios Analíticos por Octavio Mosquera y en el Laboratorio de Química de Suelo del CIAT por Gonzalo Antonio Borrero Tamayo. A continuación se enuncia parte de la bibliografía consultada.



Referencias

Benton-Jones Laboratories. s.f. Plant Analysis Techniques. Georgia, USA.

Mckean S.J. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).



CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Determinación de % humedad en suelo

Introducción

Esta propiedad física del suelo es de gran utilidad y se obtiene de una manera sencilla, pues el comportamiento y la resistencia de los suelos están regidos por la cantidad de agua que contienen.

El contenido de humedad de un suelo es la relación del cociente del peso de las partículas sólidas y el peso del agua que guarda. Esto se expresa en términos de porcentaje.

El proceso de la obtención del contenido de humedad de una muestra se hace en el laboratorio. El equipo de trabajo consiste en un horno donde la temperatura pueda ser controlable. Una vez tomada la muestra del sólido, en estado natural, se introduce al horno. Ahí, se calienta a una temperatura de más de 100 °C para producir la evaporación del agua y su escape a través de ventanillas.

Se debe tener cuidado de no sobrepasar el límite para no correr el riesgo de alterar el cociente de la determinación del contenido de humedad.

El material debe permanecer un período de 12 a 24 horas en el horno. Por esta razón, se acostumbra iniciar el calentamiento de la muestra de suelo al final del día. De este modo, se deshidrata durante toda la noche.

Cumplido el tiempo de secado de la muestra —de tamaño normal— se procede a retirar y pesar, para así obtener el peso del suelo seco.

El peso del agua será la diferencia entre el peso de la muestra en estado natural y la muestra seca del suelo.

Al contarse con los valores necesarios para la obtención del contenido de humedad (en caso de requerir de forma inmediata la obtención de resultados de ensayo), la muestra podría ser retirada del horno al cabo de 5-6 horas para así pesarla. Luego, se introduciría de nuevo al horno y se compararía este peso con el obtenido a las 12-24 horas de secado. Si no se obtiene ninguna diferencia, podría utilizarse este valor como el peso seco de dicha muestra de suelo.

Hay que tener en cuenta que los resultados finales de muchos análisis se expresan según el peso seco de suelo (p. ej., medidas de número, biomasa, etc.). Esto es de suma importancia debido a que el contenido de humedad de este puede sufrir grandes fluctuaciones en función de tiempo; mientras que el peso seco es constante.

En análisis microbiológicos, el contenido de humedad es usualmente reportado como el porcentaje de humedad relativa, el cual es igual a la masa de agua por unidad de masa de suelo seco al horno.

Este se define como:

$$\% = (m - d)/m * (100)$$

Donde; m es la masa de suelo húmedo antes del secado y d es la masa luego de secado al horno.

La disponibilidad de agua a los microorganismos es una función de cuan fuertemente está enlazada el agua a las partículas de suelo. Por lo tanto, es preferible expresar la humedad del suelo en términos del potencial de agua.

Principio

Se seca el suelo en un horno a una temperatura de 105 °C durante 24 horas. Se asume que el peso que se pierde es debido al agua en el suelo; pues a veces el suelo también pierde materia orgánica a altas temperaturas.



Equipo


- Cajas metálicas (aluminio) o de vidrio
- Pinzas metálicas o guantes de asbesto
- Horno
- Balanza



Reactivos

- No aplica

① → ② → ③ → Procedimiento

1. Pese 5 g de suelo recién recolectado y sin procesar.
2. Previa identificación y dato de la tara de las cajas, colóquelas al horno a 105 °C durante 24 horas.
3. Vaya sacando las muestras por tandas del horno. Cuando las pueda manipular, anote el peso de la tara con la muestra seca ( Precaución: coloque una lámina sobre el plato de la balanza para no colocarlas calientes directamente).
4. Descarte el suelo y realice los cálculos.



Resultados

En la hoja de datos, registre:

Peso suelo fresco (Psf) o secado al aire (aprox. 5 g)

Peso de la caja (tara)

Peso de la caja (tara) con la muestra seca (horno a 105 °C durante 24 horas)

Peso caja (tara) con suelo seco - peso caja (tara) = peso suelo seco (Pss)

Aplique la fórmula para determinar humedad:

$$\frac{Psf - Pss}{Psf} * 100 = \% \text{ humedad}$$

El resultado se expresa como porcentaje de humedad.

Nota: Cuando desee saber la humedad real del suelo en el momento de la toma de la muestra, tome el suelo y péselo directamente para el análisis.

Cuando requiera hacer una corrección de humedad en un análisis fisicoquímico (y el suelo esté muy húmedo), lo puede dejar secar unos días al aire libre (evitar luz solar) antes de realizar la determinación de humedad. Esto le facilitará la comparación de resultados entre épocas o laboratorios diferentes.

Nota:

Esta metodología corresponde a la utilizada en el Laboratorio de Química de Suelos y Nutrición de Plantas del CIAT.

Referencias

Mckean SJ. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Una Guía Teórica y Práctica de Metodologías. Laboratorio de Servicios Analíticos. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgiar.org

Protocolo de incubación de suelo para nitritos, nitratos y amonio

Introducción

El nitrógeno (N) se encuentra en el suelo en forma orgánica e inorgánica, en mayor proporción, en los materiales orgánicos complejos del suelo.

Compuestos nitrogenados inorgánicos

Las formas inorgánicas del nitrógeno del suelo incluyen: amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) y nitrógeno elemental (N_2). Desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, los más importantes son: NH_4^+ , NO_3^- y NO_2^- ; en cambio, el N_2O y el NO se pierden en el proceso de desnitrificación.

Compuestos nitrogenados orgánicos

Las formas orgánicas del nitrógeno del suelo se encuentran en forma de aminoácidos, proteínas, aminoazúcares y otras formas complejas. Estas últimas se producen durante la reacción del amonio con la lignina, y en la polimerización de quinonas y compuestos nitrogenados, así como en la condensación de azúcares y aminas. El nitrógeno en los aminoácidos y proteínas (que se encuentran en combinación con arcillas, lignina y otros minerales) se mantiene estable.

La **mineralización** del N es el proceso de transformación de N orgánico a la forma mineral (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-). Por el contrario, la inmovilización del N es el proceso de conversión del N inorgánico o mineral al estado orgánico. Si el suelo se trabaja, como sucede al arar, hay aumento inmediato y rápido de la mineralización.

Al proceso de oxidación biológica del amoníaco, se le llama **nitrificación**, el cual lleva dos etapas de transformación del amoníaco. Primero, en nitrito (NO_2^-) por un género de bacterias heterótrofas (*Nitrosomonas* spp.) mediante la reacción química representada por la ecuación:



y luego en nitrato (NO_3^-) por el grupo de bacterias autótrofas (*Nitrobacter* spp.) mediante la reacción química representada por la ecuación:



Colectivamente se les denomina bacterias nitrificantes o nitrobacterias a las *Nitrosomonas* spp. y a las *Nitrobacter* spp.

En cuanto a los factores que afectan al proceso de nitrificación, están: el suministro del ion amonio, la población presente de organismos nitrificantes, el pH, la aireación, la humedad y la temperatura del suelo.

La nitrificación es un proceso clave en el ciclo del N al producirse nitratos a través de la actividad microbiana, y puede generar pérdidas de fertilizante nitrogenado por medio de la lixiviación y desnitrificación.

Algunas plantas (como *Brachiaria humidicola*) pueden suprimir la nitrificación del suelo mediante la liberación de inhibidores en sus raíces (exudados), lo cual se conoce como **inhibición biológica de la nitrificación (IBN)** o en sus siglas en inglés **BNI**. Esta capacidad, que es provocada o regulada por la disponibilidad de amonio (NH_4^+) en la rizósfera de las pasturas, inhibe no solo la nitrificación sino también las emisiones de óxido nitroso.

Así, el estudio del BNI puede convertirse en una poderosa estrategia enfocada hacia el desarrollo de sistemas agronómicos de baja nitrificación, lo cual beneficiaría tanto a la agricultura como al medio ambiente.

Principio

La dinámica de las diferentes formas de nitrógeno en el suelo está regulada por la actividad microbiana que los usa como sustrato para su metabolismo. Cuantificar el sustrato (amonio) y el producto metabólico de la nitrificación (nitrato), en una escala temporal, permite establecer la actividad de los microorganismos nitrificantes en suelo. Esta actividad expresada como tasa de producción de nitrato (o consumo de amonio) en el tiempo, comparada entre diferentes plantas, permite diferenciar genotipos con alto o bajo IBN; por tanto, se asume que una tasa de nitrificación baja es debida a la inhibición mediada por los compuestos IBN exudados al suelo.

El suelo se incuba después de la adición del fertilizante N-NH_4^+ y se monitorea la acumulación del N-NO_3^- y el consumo de N-NH_4^+ en el tiempo. La dinámica de las dos formas de N evaluadas es dependiente de las propiedades físicas y químicas de los suelos a evaluar.



Equipo

- Barreno
- Bolsas plásticas
- Frascos viales de vidrio (8–10 ml) con tapa perforada o parafilm (ámbar de preferencia)
- Frascos plásticos para extractos
- Papel filtro *Whatman* No. 2 o No. 5
- Agitador
- Refrigerador
- Incubadora



Reactivos

- Sulfato de amonio 99% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Cloruro de potasio 99,5% KCl
- Sulfato de calcio hidrato $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- DCD (dicyandiamide) si se va a usar inhibidor sintético de la nitrificación



Preparación de soluciones

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,015 M: 2,6 g/L

KCL 1 M: 74,55 g/l

Solución de incubación

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,003562 g/ml

(27 mM) = 750 mg N/L

Disuelva en 100 ml de agua bidestilada 0,356 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

= Disuelva en 500 ml de agua bidestilada 1,78 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Solución de incubación si usa 10% DCD

(inhibidor sintético de la nitrificación)

Disuelva en 100 ml de agua bidestilada 0,320 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 12,7 mg de DCD.

① → ② → ③ → Procedimiento

1. **Colecta:** suelo (0–10 cm) de la rizósfera debidamente identificado. Homogenice la muestra en la bolsa de colecta y lleve al laboratorio al proceso de secado.
2. **Secado:** seque el suelo colectado durante 2–3 días a temperatura ambiente (para trabajar peso con base en el suelo seco).
3. **Homogenice** el suelo seco usando tamiz de 2 mm de diámetro.
4. **Cantidad a pesar y tiempos:**
 - 3 g suelo CIAT (pH 7,5 -alta nitrificación) o,
 - 5 g suelo Llanos (pH 4,3 -baja nitrificación)

Use frascos plásticos para el nivel basal, y frascos viales para la incubación.

Realice triplicados para asegurar diseño experimental.

5. **Niveles basales de amonio y nitrato:** distribuya 3 g (suelo CIAT) o 5 g (suelo Llanos) de suelo por muestra en frascos plásticos con tapa. Extraiga inmediatamente con KCl 1M (30 o 50 ml según la cantidad de suelo). Esta medición corresponde al nivel basal de amonio (NH_4) y nitrato (NO_3) en el suelo a evaluar sin adición de ningún reactivo diferente al extractante. Si va a determinar el nitrito (NO_2) pese una serie adicional de suelo para, al final, realizar la respectiva extracción para este.
6. **Pesar y distribuir** 3 g (suelo CIAT) o 5 g (suelo Llanos) de suelo por muestra con 5 tiempos en frascos viales (preferiblemente ámbar) para distribuir en tiempos de incubación un total de 5 tiempos a saber: T0-T2-T4-T6 y T8. Tiempo es igual a días de incubación; así que identifíquelos adecuadamente.
7. **Solución de incubación:** adicione 0,8 ml (suelo CIAT) o 1,5 ml (suelo Llanos) de solución de incubación [sulfato de amonio 27 mM (NH_4)₂SO₄ 0.003562 g/ml] a cada muestra y selle con *parafilm* y adhesivo redondo de papel. Para esto, con una aguja, abra un agujero (igual para todos), así permitirá el intercambio gaseoso o realícelo con tapa rosca con agujero.
8. **Preincubación:** para activar el proceso, coloque estos frascos en la incubadora a 25 °C; en un principio durante 4 días (suelo CIAT) y 11 días (suelo Llanos). Este proceso se denominará preincubación.
9. **Incubación:** a partir del día número 4 y 12 dará inicio al proceso de incubación para suelos CIAT y suelos Llanos, respectivamente. Desde ese día, inicie el conteo como T0 de incubación y así sucesivamente hasta T8. (Esto le dará un total real de 12 días en la incubadora para suelo CIAT y de 19 días para suelo Llanos). Realice la extracción a partir del T0 cada 2 días hasta T8.
10. **Extracción:** una vez culmine el tiempo de incubación para cada muestra (tiempos), adicione 30 ml o 50 ml de KCl 1 M para cuantificar amonio (NH_4) y nitrato (NO_3). Esto dependerá del tipo de suelo (CIAT o Llanos) y/o de CaSO₄ 0,015 M [para cuantificar nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3)]. **Agite** (con agitador horizontal a 200 rpm) durante 30 min a temperatura ambiente. **Filtre** con papel *Whatman* No. 2 o 5. Recoja el extracto en frasco plástico y almacenar a 4 °C hasta la realización del análisis. Trate de mantener este extracto por poco tiempo e identifíquelo de forma correcta. Lo puede ir leyendo a medida que se realicen las extracciones.
11. **Determine** por espectroscopia UV visible el amonio (NH_4) a una longitud de onda de 667 nm y el nitrato (NO_3) a 410 nm en extracto KCl 1 M (ver protocolos para NH_4 y NO_3).

12. **Establezca** por espectroscopia (UV visible el nitrato (NO_3) a una longitud de onda de 410 nm y el nitrito (NO_2) a 543 nm en los extractos de CaSO_4 0,015 M (ver protocolos para NO_3 y NO_2).
13. **Calcule** los cambios de N- NO_2 , N- NO_3 y N- NH_4 en los suelos durante la incubación. Grafique y determine % de nitrificación, donde:

$$\% \text{ Nitrificación} = \frac{\text{NO}_3 \times 100}{\text{NO}_3 + \text{NH}_4}$$

Además, se debe estimar la tasa de producción de nitrato/consumo de amonio, de acuerdo con la pendiente de la recta graficada para los 5 tiempos de incubación.

Nota:

Inicialmente, este protocolo fue usado en el Laboratorio de Gases por María del Pilar Hurtado Sánchez. Luego, fue estandarizado por Sandra Patricia Loaiza en febrero de 2004. Posteriormente, fue adaptado en el Laboratorio de Nutrición de Plantas del CIAT por Gonzalo A. Borrero Tamayo en el 2011. Años después, fue modificado y adaptado por Jacobo Arango y Danilo Moreta (2013–2014) en el Laboratorio de BNI del CIAT.

Referencias

- Núñez J. 2015. Potencial de la inhibición biológica de la nitrificación en forrajes tropicales (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Palmira, Colombia.
- Subbarao GB; Nakara K; Hurtado MP; Ono H; Moreta DE; Salcedo AF; Yoshihashi AT; Ishikawa T; Ishitani M; Ohnishi-Kameyama M; Yoshida M; Rondón M; Rao IM; Lascano CE; Berry WL; Ito O. 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:17302–17307.

CONTACTOS

Jacobo Arango
j.arango@cgjar.org

Jonathan Núñez
j.n.potes@cgjar.org

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo
g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de nitrito (NO_2^-) en suelo

Introducción

Los nitritos se forman debido a la oxidación biológica de las aminas y del amoníaco. A su vez, por la reducción del nitrato en condiciones anaeróbicas.

En el suelo, las bacterias (en especial las nitrificantes del género *Nitrosomas* sp.) transforman el amonio (NH_4^+) y la forma de nitrógeno (N) —en la mayoría de los fertilizantes comerciales— en nitrito (NO_2^-). Luego, estos NO_2^- son oxidados a nitratos (NO_3^-) por las *Nitrobacter* sp. En el proceso, estas liberan óxido nitroso (N_2O): un gas potente de efecto invernadero.

Aunque el NO_3^- es crucial para el crecimiento de casi todos los cultivos, la mayor parte del NO_3^- es lixiviada hacia el subsuelo y, a menudo, contamina las aguas superficiales y subterráneas. Este proceso es más rápido a un pH de 7-8 y a una temperatura de 25-30 °C. Esta nitrificación hace que el pH del agua disminuya.

Por lo tanto, si se encontrara una manera de desacelerar la nitrificación a una tasa compatible con un buen crecimiento de los cultivos, se reduciría el requerimiento de fertilizante y se minimizaría el impacto nocivo de la agricultura en el ambiente.

Principio

Para la determinación del nitrito (NO_2^-), se realiza su extracción con sulfato de calcio (CaSO_4 0,015 M), ya sean basales o incubados a varios tiempos T0-T2-T4-T6 y T8 (días de incubación). A su vez, de este mismo extracto se puede analizar el nitrato (NO_3^-).

La determinación de nitrito (NO_2^-) en suelos se basa en la formación de complejos coloreados con estos iones. Estos complejos acuosos son de color rosa, resultado de la reacción de este ion con el ácido fosfórico y la sulfanilamida en presencia de NED [dihidrocloruro de N-(1 naftil) etilendiamina]. La intensidad del color se estima en un espectrofotómetro (UV-VIS).

Equipo

- Material de vidrio de laboratorio
- Transfer pipeta
- Agitador (vortex)
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Nitrito de sodio 99% NaNO_2
- Ácido fosfórico 85% H_3PO_4
- Sulfanilamida $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
- Dihidrocloruro de N-(1 naftil) etilendiamina (NED)
- Sulfato de calcio $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Preparación de soluciones

Reactivo color

Volumen de la solución	H_3PO_4 (85%)	Sulfanilamida	NED	Agua desionizada
100 ml	10 ml	4 g	0,1 g	90 ml

Refrigere y empaque en frasco ámbar

Solución patrón de nitrito de 50 ppm: NO₂ 50 ppm

Pese 0,0037 g de NaNO₂ y enrasede a 50 ml con agua destilada

Solución extractora

CaSO₄·2H₂O 0,015M: 2,6 g/l

Curva de calibración

A partir de la solución de 50 ppm, prepare 50 ml de solución 2 ppm: tome 2 ml de la solución 50 ppm NO₂⁻ y complete con agua destilada a volumen de 50 ml.

Concentración ppm (balón de 50 ml con agua)	Volumen de la solución NO ₂ ⁻ 2 ppm
0 ppm Solución CaSO ₄ 0,015 M	0 ml
0 pp agua destilada	0 ml
0,005 ppm	125 µl
0,015 ppm	375 µl
0,030 ppm	750 µl
0,1 ppm	2,5 ml

Concentración ppm (balón de 50 ml con agua)	Volumen de la solución NO ₂ ⁻ 50 ppm
0,2 ppm	200 µl
0,3 ppm	300 µl
0,5 ppm	500 µl
1 ppm	1000 µl (1 ml)
2 ppm	2 ml
4 ppm	4 ml

① → ② → ③ → Procedimiento

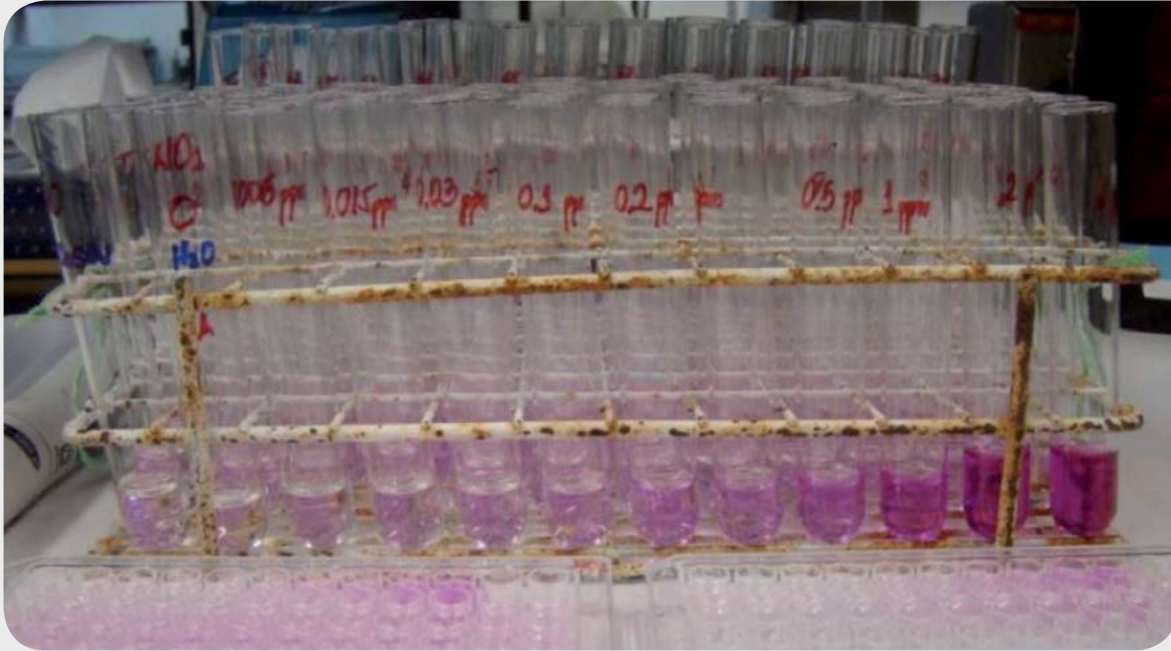
Tanto para las muestras como para los puntos de la curva.

Pese 3 g de suelo fresco (seco al aire, molido y tamizado a 2 mm).

Adicione 30 ml de CaSO₄ 0,015M y coloque en un agitador horizontal a 200 rpm durante 30 min. Mediante filtración (papel *Whatman* No. 2 o 5) recoja el extracto en frascos plásticos y guárdelo en el refrigerador para su análisis. Realícelo para cada tiempo de incubación determinado (en nuestro caso, para T0-T2-T4- T6 y T8). De este mismo extracto, puede determinar el nitrato (NO₃⁻).

1. Tome 2 ml de muestra o de los estándares. Incluya blancos con agua o con sulfato de calcio.
2. Adicione 0,5 ml de reactivo de color para determinar el nitrito.
3. Agite la solución y dejar enfriar. Las soluciones toman un color violeta (rosado) y la intensidad del color depende de la concentración del NO₂⁻.
4. Traslade cuidadosamente con transferpipeta 200 µl de cada muestra a cada pozo del plato (placa multipozos). Trate de adicionar la misma cantidad cada vez e identifique muy bien las muestras.
5. Lea las muestras o los estándares a 543 nm; en este caso, en un equipo *Synergy* HT (*BioTek* Co.). En caso de dilución, realícela con agua destilada.

6. Estime los cálculos correspondientes.



Muestras para la realización de la curva de nitrito.



Resultados

Mediante una ecuación lineal, determine las concentraciones y expréselas en mg.kg^{-1} . Realice la corrección de humedad (para expresarlo en base a peso seco). Calcule y presente el resultado como N-NO_2 (mg.kg^{-1}).

Peso molécula de $\text{NO}_2 = 46 \text{ g}$

Peso atómico del N = 14 g

Relación $\text{N/NO}_2 = 14/46 = 0,3043$

$\text{NO}_2 (\text{mg.kg}^{-1}) * 0,3043 = \text{N-NO}_3$

Nota:

Este protocolo es el usado en el Laboratorio de Gases del CIAT por María del Pilar Hurtado Sánchez, el cual fue implementado por Sandra Patricia Loaiza en febrero de 2004. Posteriormente, fue adaptado por Gonzalo A. Borrero Tamayo para el Laboratorio de Nutrición de Plantas del CIAT. A continuación, se enuncia parte de la bibliografía consultada.

Referencias

Norman RJ; Stucki JW. 1981. The determination of nitrate and nitrite in soil extracts by ultraviolet spectrophotometry. Soil Sci Soc. Am J 45:347-353.

Norman RJ; Edberg JC; Stucki JW. 1985. Determination of nitrate in soil extracts by dual - wavelenght ultraviolet spectrophotometry. Soil Sci Soc. Am J 49:1182-1185.

Singh JP. 1988. A rapid method for determination of nitrate in soil and plant extracts. Plant and Soil 110(1):137-139.

CONTACTOS

Jacobo Arango

j.arango@cgjar.org

Jonathan Núñez

j.n.potes@cgjar.org

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de nitrato (NO_3^-) en suelo

Introducción

Los nitratos son la forma de nitrógeno (N) más relevante que absorben las plantas. El contenido de nitratos del suelo es variable y depende de factores como la temperatura, la humedad, el estado vegetativo del cultivo, el manejo del suelo, etc.

Durante su transporte a través del subsuelo, los nitratos se ven afectados por un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos que influyen en su movimiento, transformación y distribución. Entre estos, están las reacciones de oxidación-reducción (nitrificación, desnitrificación), los procesos de adsorción y absorción, la volatilización de amoníaco y la mineralización de compuestos nitrogenados (Hill, 1996; Hunter et al., 1998).

La nitrificación es el proceso por el cual el nitrógeno (N) es transformado por la acción de los microorganismos de la forma amoniacal a nitritos (NO_2^-) y posteriormente a nitratos (NO_3^-).

El proceso es de gran importancia agrícola debido a que, si bien algunas plantas pueden aprovechar el nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+), para la mayoría de estas, la forma más disponible es la de NO_3^- .

El proceso de nitrificación se realiza bajo condiciones aeróbicas, es decir, en presencia de oxígeno (O_2) libre. En general, la transformación de NO_2^- a NO_3^- ocurre a tasas más altas que la conversión de NH_4^+ a NO_2^- .

Principio

Se determina NO_3^- tanto en los extractos con KCl 1 M como en aquellos con sulfato de calcio (CaSO_4 0,015 M); sea para el nivel basal como para los que llevan días de incubación a varios tiempos (T0-T2-T4, T6 y T8).

Extractos KCl 1 M (este es el que se realiza actualmente en el laboratorio)

Pese 3 g de suelo fresco (seco al aire, molido y tamizado a 2 mm) y adicione 30 ml de solución KCl 1 M. Colóquelo en un agitador horizontal a 200 rpm durante 30 min. Así, se extrae el NO_3^- .

Mediante filtración (papel *Whatman* No. 2 o 5), recoja el extracto en frascos plásticos y guárdelo en refrigerador para su análisis (use este mismo extracto para determinar NH_4^+).

Extractos CaSO_4 0,015 M

Pese 3 g de suelo fresco (seco al aire, molido y tamizado a 2 mm) y adicione 30 ml de CaSO_4 0,015 M. Coloque en un agitador horizontal a 200 rpm durante 30 min. Así, se extrae el NO_3^- .

Mediante filtración (papel *Whatman* No. 2 o 5), recoja el extracto en frascos plásticos y guárdelo en refrigerador para su análisis (use este mismo extracto para determinar nitrito (NO_2^-)).

La estimación del nitrato (NO_3^-) en suelos se basa en la formación de un complejo acuoso de color amarillo. Este se forma por la reacción de este ion con ácido sulfúrico y salicilato de sodio en presencia de sulfamato de amonio (para evitar interferencias de ion nitrito). La intensidad del color se determina en un espectrofotómetro UV-VIS.



Equipo

- Material de vidrio de laboratorio
- Transferpipeta
- Agitador (Vortex)
- Espectrofotómetro



Reactivos

- Cloruro de potasio 99,5% KCl
- Nitrato de potasio 99% KNO_3
- Salicilato de sodio 99,5% $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$
- Cloruro de sodio 99,5% NaCl
- Sulfamato de amonio 98% $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$
- Hidróxido de sodio NaOH
- Ácido sulfúrico concentrado – grado analítico 97% H_2SO_4



Preparación de soluciones

- a. Cloruro de potasio (KCl) 1 M: pese 74,55 g y enrase a 1 litro con agua.
- b. Solución de nitrato de 50 ppm: pese 0,0041 g de nitrato de potasio KNO_3 y enrase a 50 ml con agua desionizada.
- c. Solución NaOH 0,01 M: pese 0,04 g de NaOH y enrase a 100 ml con agua bidestilada (0,02 g/50 ml).
- d. Solución TRI: disuelva los 3 siguientes reactivos (TRI= triple solución) en 100 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 0,01 M
 - 1,0 g de salicilato de sodio
 - 0,2 g de NaCl
 - 0,1 g de sulfamato de amonio
- e. Hidróxido de sodio al 40%: disuelva 40 g de NaOH y enrase a 100 ml con agua bidestilada.

Curva de calibración

Prepare los diferentes puntos en balones de 50 ml y llévelos a este volumen con solución de KCl 1 M; luego, adicione la solución estándar nitrato (NO_3^-) de 50 ppm según la tabla siguiente:

Enrase a 50 ml con KCl 1 M

Concentración ppm (balón de 50 ml con solución KCL 1 M)	Volumen de la solución NO ₃ ⁻ (50 ml matraz volumétrico) 50 ppm	Volumen de la solución NO ₃ ⁻ (25 ml matraz volumétrico) 50 ppm
0 ppm solución CaSO ₄ 0,015 M	0 ml	0 ml
0 pp solución KCl 1M	0 ml	0 ml
0,5 ppm	0,5 ml	0,25 ml
1 ppm	1 ml	0,5 ml
2 ppm	2 ml	1 ml
4 ppm	4 ml	2 ml
6 ppm	6 ml	3 ml
8 ppm	8 ml	4 ml
10 ppm	10 ml	5 ml
15 ppm	15 ml	7,5 ml
20 ppm	20 ml	10 ml
30 ppm	30 ml	15 ml

① → ② → ③ → Procedimiento

Si va a determinar NO₃⁻ de muestras que se van a incubar, proceda de la siguiente manera:

1. Pesar 3 g de suelo fresco (previo secado al aire, molido y tamizado a 2 mm).
2. Adicione 30 ml de CaSO₄ 0,015 M si, a su vez, va a determinar el NO₂⁻; si va calcular el NO₃⁻ y NH₄⁺ agregue 30 ml de KCl 1 M.
3. Agite con un agitador horizontal a 200 rpm durante 30 min.
4. Filtre (papel *Whatman* No. 2 o 5), recoja el extracto en frascos plásticos. Consérvelo en refrigerador para su análisis. Realícelo por cada tiempo de incubación determinado (en nuestro caso, para T0-T2-T4-T6 y T8).

Si las muestras no van incubadas y va a realizar el análisis directo de NO₃⁻, proceda de la siguiente manera:

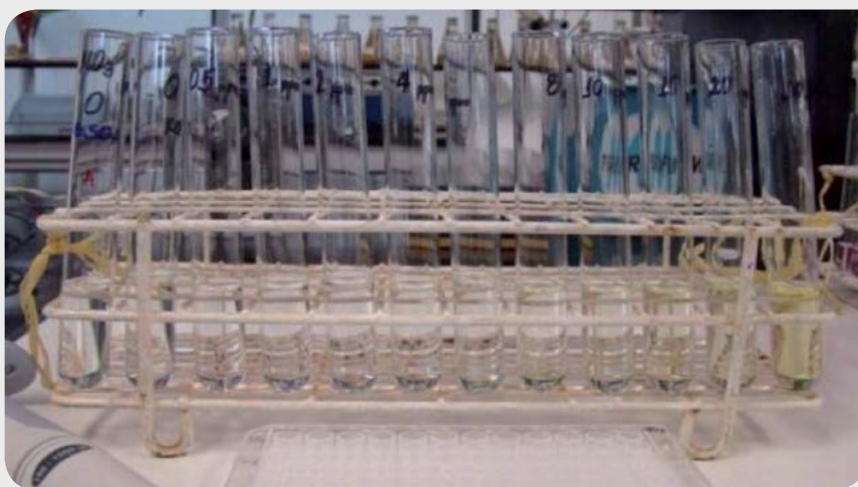
5. Pese 2 (3) g de suelo fresco (previo secado al aire, molido y tamizado a 2 mm).
6. Adicione 20 (30) ml de solución KCl 1 M.
7. Agite (agitador horizontal a 200 rpm), durante 30 min.
8. Mediante filtración (papel *Whatman* No 2 o 5), recoja el extracto en frascos plásticos y guárdelo en el refrigerador para su análisis (use este mismo extracto para determinar NH₄⁺).

Coloración para NO₃⁻

Tanto para las muestras como para los puntos de la curva.

1. Transfiera 0,5 ml de la muestra o del estándar a un tubo de ensayo. Es recomendable incluir un blanco con el agua o con la solución (KCl o CaSO₄) que se utilice en el análisis.
2. Adicionar 0,25 ml de la solución TRI, mezcle bien y espere por un minuto para que la reacción termine.
3. Evapore, hasta que quede seco, en el horno a una temperatura de 100 °C (observará un sólido blanco). Lo puede mantener a menor temperatura y controlar que no se calcinen las muestras.

4. Cuando lo saque del horno y lo deje enfriar, adicione 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (grado analítico) por las paredes para que reaccione. Deje reposar 5 minutos.
5. Adicione 2,5 ml de agua destilada, agite y deje reposar unos minutos.
6. Agregue 2,5 ml de NaOH al 40% y deje enfriar.
7. Agite la solución con mucho cuidado (vortex a baja velocidad) para evitar que la solución se caliente. Deje enfriar. Las soluciones tomarán un color amarillo y la intensidad del color dependerá de la concentración del NO_3^- .
8. Traslade cuidadosamente, con transferpipeta, $200 \mu\text{l}$ de cada muestra a cada pozo del plato (placa multipozos); trate de adicionar la misma cantidad cada vez e identifique muy bien las muestras.
9. Lea las muestras o los estándares a 410 nm; en este caso en equipo *Synergy* HT (*BioTek* Co.). Si realiza una dilución, use agua bidestilada.



Muestras utilizadas para realizar la curva de nitrato.

Resultados

Mediante una ecuación lineal, determine las concentraciones y expresaselas en mg.kg^{-1} . Realice la corrección de humedad (para expresarlo con base en el peso seco). Calcule y enuncie el resultado como N-NO_3 (mg.kg^{-1}).

Peso molécula de $\text{NO}_3 = 62 \text{ g}$

Peso atómico del N = 14 g

Relación $\text{N/NO}_3 = 14/62 = 0,23$

$$\text{NO}_3 \text{ (mg.kg}^{-1}\text{)} * 0,23 = \text{N-NO}_3$$

Nota:

Este protocolo es el usado en el Laboratorio de Gases del CIAT por María del Pilar Hurtado Sánchez, el cual fue implementado por Sandra Patricia Loaiza en febrero de 2004. Posteriormente, fue adaptado por Gonzalo A. Borrero Tamayo para el Laboratorio de Nutrición de Plantas del CIAT en 2011, y por Jacobo Arango y Danilo Moreta en 2014.

 **Referencias**

- Hill AR. 1996. Nitrate removal in stream riparian zones. *J. Environ. Qual.* 25:743-755.
- Hunter KS; Wang Y; Van Cappellen P. 1988. Kinetic modeling of microbially-driven redox chemistry of subsurface environments: coupling transport, microbial metabolism and geochemistry. *J. Hydrol.* 209:53-80.
- Norman RJ; Stucki JW. 1981. The determination of nitrate and nitrite in soil extracts by ultraviolet spectrophotometry. *Soil Sci Soc. Am J* 45:347-353.
- Norman RJ; Edberg JC; Stucki JW. 1985. Determination of nitrate in soil extracts by dual - wavalength ultraviolet spectrophotometry. *Soil Sci Soc. Am J* 49:1182-1185.
- Singh JP. 1988. A rapid method for determination of nitrate in soil and plant extracts. *Plant and Soil.* 110(1):37-139.

 **CONTACTOS**

Jacobo Arango

j.arango@cgjar.org

Jonathan Núñez

j.n.potes@cgjar.org

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Determinación de amonio (NH_4^+) en suelo

Introducción

Los microorganismos son fundamentales y desempeñan un papel significativo en el ciclo del nitrógeno (N) en el suelo. Estos fijan el N y participan en la nitrificación y desnitrificación así como en su inmovilización. En cuanto a su presencia, este elemento se reporta en fracciones importantes en el amonio (NH_4^+) y en los nitratos (NO_3^-) (Maynard y Kalra, 1993; Foster, 1995).

El NH_4^+ intercambiable se define como el amonio que puede extraerse con una solución neutra de ion

potasio (K) a temperatura ambiente. Así, las sales de K^+ más utilizadas son el K_2SO_4 0,05 M y KCl de 0,1 a 2 M, (concentraciones de las cuales depende la capacidad de extracción).

Posteriormente se cuantifica el NH_4^+ en el extracto. Para esto, se emplea una gran variedad de métodos, tales como técnicas colorimétricas, microdifusión, técnicas con arrastre de vapor, análisis de inyección de flujo y electrodo de ion selectivo (Maynard y Kalra, 1993).

Principio

Para extraer el NH_4^+ , primero pese 3 g de suelo (previo secado al aire, molido y tamizado a 2 mm); luego, adicione 30 ml de KCl M. A continuación, agite (agitador horizontal a 200 rpm) durante 30 min y mediante filtración (papel *Whatman* No. 2 o 5), recoja el extracto en frascos plásticos con tapa. Guárdelo en el refrigerador para su análisis (use este mismo extracto para determinar NO_3^-).

La determinación de NH_4^+ en suelos se fundamenta en la formación de un complejo verdoso que se desarrolla por la reacción de este ion con amoníaco, hipoclorito de sodio, EDTA y salicilato en presencia de nitroprusiato de sodio. La intensidad del color se mide en un espectrofotómetro UV-VIS.

Equipo

- Material de vidrio de laboratorio
- Transferpipeta
- pH metro (conductímetro)
- Agitador (Vortex)
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Cloruro de potasio 99,5% KCl
- Sulfato de amonio 99% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Salicilato de sodio 99,5% $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$
- Nitroprusiato de sodio 100% $(\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{NO})(\text{CN})_5] \cdot 2\text{H}_2\text{O})$
- Hipoclorito solución 5,25% NaClO
- Fosfato de sodio dibásico 99% Na_2HPO_4
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 99% $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Hidróxido de sodio (lentejas) 99% NaOH



Preparación de soluciones

- Cloruro de potasio 1 M (KCl 1 M):** pese 74,55 g y enrase a 1 litro con agua.
- Solución de amonio de 100 ppm:** pese 0,3668 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y enrase a 1 litro con agua (guarde refrigerado).
- Reactivo de salicilato-nitroprusiato:** disuelva 7,813 g de salicilato de sodio y 0,12 g de nitroprusiato de sodio en 80 ml de agua (libre de NH_4^+). Diluya y enrase a 100 ml. Mezcle bien y almacene usando una botella de ámbar. Este reactivo debe prepararlo semanalmente para mayor sensibilidad (guárdelo refrigerado).
- Reactivo hipoclorito-buffer:** disuelva 2,7866 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) en aproximadamente 70 ml de solución de NaOH 1 M. Adicione 20 ml de solución de hipoclorito de sodio (NaOCl al 5,25%). Verifique y ajuste el valor del pH a 13 con NaOH 1 M; complete hasta un volumen final de 100 ml.
- Reactivo EDTA:** disuelva 6 g de EDTA (sal pH 7), mezcle bien y diluya; complete hasta un volumen final de 100 ml.

Curva de calibración

Para preparar la curva, tome la solución estándar de amonio de 100 ppm y los volúmenes de esta solución de acuerdo a la concentración que se desea preparar.

Prepare los diferentes puntos en balones de 50 ml y llévelos hasta ese volumen con una solución de KCl 1 M, luego de la adición de la solución estándar de NH_4^+ 100 ppm según la tabla siguiente:

Cálculo para preparación de la curva

Concentración ppm (balón de 50 ml con solución KCl 1 M)	Volumen de la solución NH_4^+ (matraz volumétrico de 50 ml) 100 ppm	Volumen de la solución NH_4^+ (matraz volumétrico de 25 ml) 100 ppm
0 ppm Solución KCl 1 M	0 ml	0 ml
0,5 ppm	0,25 ml	0,125 ml
1 ppm	0,5 ml	0,25 ml
2 ppm	1 ml	0,5 ml
4 ppm	2 ml	1 ml
6 ppm	3 ml	1,5 ml
8 ppm	4 ml	2 ml
10 ppm	5 ml	2,5 ml
15 ppm	7,5 ml	3,75 ml
20 ppm	10 ml	5 ml
30 ppm	15 ml	7,5 ml
40 ppm	20 ml	10 ml

① → ② → ③ → Procedimiento

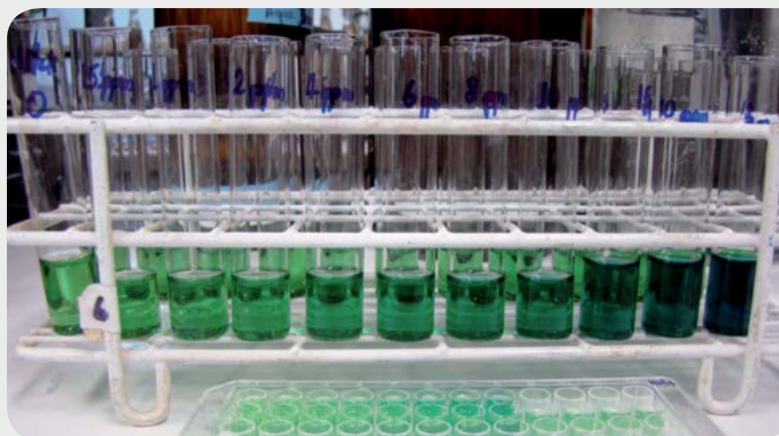
- Pese 3 g de suelo fresco.
- Adicione 30 ml de solución KCl 1 M.

3. Agite (agitador horizontal a 200 rpm) durante 30 min.
4. Mediante filtración (papel *Whatman* No. 2 o 5), recoja el extracto en frascos plásticos y guárdelo en refrigerador para su análisis (use este mismo extracto para determinar NO_3^-).

Coloración

Tanto para las muestras como para los puntos de la curva.

5. Transfiera 1 ml de la muestra o del estándar a un tubo de ensayo. Es mejor incluir un blanco con el agua o con la solución KCl 1 M que se utilice en el análisis.
6. Adicione 0,5 ml de EDTA, mezcle bien y espere por un minuto para que la reacción termine.
7. Adicione 1 ml del reactivo salicilato nitroprusiato.
8. Adicione 1 ml del reactivo hipoclorito buffer. Deje reposar por 1 hora para el desarrollo del color (verdoso).
9. Traslade cuidadosamente con transferpipeta, $200 \mu\text{l}$ de cada muestra a cada pozo del plato (placa multipozos). Trate de adicionar la misma cantidad cada vez, identificando muy bien las muestras.
10. Lea a 667 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS. En este caso, en un equipo *Synergy HT* (*BioTek Co.*). En caso de dilución, realícela usando agua bidestilada.



Muestras utilizadas para la realización de una curva de amonio.



Resultados

Mediante una ecuación lineal, determine las concentraciones y expréselas en mg.kg^{-1} . Realice la corrección de humedad (para expresarlo con base en el peso seco) y realice el cálculo para enunciar el resultado como N-NH_4 (mg.kg^{-1}).

Peso molécula de $\text{NH}_4 = 18 \text{ g}$

Peso atómico del N = 14 g

Relación $\text{N/NH}_4 = 14/18 = 0,78$


$$\text{NH}_4 (\text{mg.kg}^{-1}) * 0,78 = \text{N- NH}_4$$

Nota:

Este protocolo es usado en el Laboratorio de Gases del CIAT por María del Pilar Sánchez. Fue implementado por Sandra Patricia Loaiza en febrero de 2004. Posteriormente, fue adaptado por Gonzalo A. Borrero Tamayo para el Laboratorio de Nutrición de Plantas del CIAT en 2011, y por Jacobo Arango y Danilo Moreta en 2014. A continuación, se enuncia la bibliografía citada y parte de la consultada.

 **Referencias**

- Foster J. 1995. Soil Nitrogen. En: Alef K; Nannipieri P. Eds. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. San Diego, USA. Academic Press. pp. 79–87.
- Maynard C; Kalra YP. 1993. Nitrate and exchangeable ammonium nitrogen. Nitrate and exchangeable ammonium nitrogen. En: Carter MR. Ed. Soil sampling and methods of soil analysis. Canadian Society of Soils Science. Florida, USA: Lewis Publishers. pp. 25–38.
- Norman RJ; Stucki JW. 1981. The determination of nitrate and nitrite in soil extracts by ultraviolet spectrophotometry. Soil Sci Soc. Am J. 45:347–353.
- Norman RJ; Edberg JC; Stucki JW. 1985. Determination of nitrate in soil extracts by dual - wavelenght ultraviolet spectrophotometry. Soil Sci Soc. Am J. 49:1182–1185.
- Singh JP. 1988. A rapid method for determination of nitrate in soil and plant extracts. Plant and Soil. 110(1):137–139.

 CONTACTO
Jacobo Arango
j.arango@cgjar.org

Fraccionamiento secuencial de fósforo *

Introducción

A pesar de las altas cantidades de fósforo (P) en el suelo, este puede ser un factor limitante para la nutrición de los cultivos en los suelos ácidos. Esto se atribuye a la precipitación del P con aluminio (Al), hierro (Fe) o con calcio (Ca); o a la absorción del P por las fracciones minerales y coloidales del suelo.

Además, los niveles de las diferentes formas de P en el suelo aumentan o disminuyen durante la fertilización; estas pueden estar en depósitos (*pools*) o en fuentes P disponibles para la planta (Schmidt et al., 1996).

Así, la caracterización de los *pools* de fósforo inorgánico (Pi) y fósforo orgánico (Po) es fundamental para comprender mejor el ciclo de P en el sistema suelo-planta (Gijssman et al., 1996).

Para dicha caracterización, a continuación se describe el procedimiento de fraccionamiento secuencial de fósforo (P) de Hedley et al. (1982a), Tiessen y Moir (1993), Oberson et al. (1995) y Oberson (1996) ligeramente modificado por Gonzalo Borrero en el año 1998 y aplicado en el Laboratorio de Química de Suelos del CIAT.

Este método emplea una serie de soluciones que incrementan en forma escalonada su poder extractante. Así, según su grado de biodisponibilidad y su estado químico, va removiendo las formas de P más estables y subdivide el P total en fracciones de P inorgánico (Pi) y P orgánico (Po) lábiles y estables.

El esquema del fraccionamiento se diseña con el fin de comparar la habilidad de las plantas para extraer el P de los depósitos del suelo frente al incremento de la resistencia de esta para absorber el P (Hedley et al., 1982b). En este método, los extractantes simulan a los *pools* de P.

En consecuencia, esta extracción secuencial pretende cuantificar el Pi lábíl (disponible), el Pi asociado al Ca, el Pi asociado al Fe + Al, así como los formas de Po lábiles y estables.

De este modo, las formas de Pi extraídas son: Pi en equilibrio con la solución del suelo; Pi asociado con las superficies de sesquióxidos o carbonatos (Mattingly, 1975); Pi asociado con compuestos de Fe y Al (Williams et al., 1980) y Pi unido al Ca. También, se incluyen los minerales primarios de P (Williams et al., 1971).

El concepto básico detrás de este procedimiento de la extracción secuencial es que los extractantes se seleccionan de tal forma que, de modo relativo, las formas lábiles de Pi y Po se remueven primero del suelo. Posteriormente, ocurre la remoción de las formas más estables por medio de extractantes químicos más fuertes.

Estos extractantes son en su orden y en aplicación diaria: H₂O y resinas intercambiadoras iónicas (2 por tubo), soluciones de NaHCO₃ 0,5 M, NaOH 0,1 M, HCl 1 M y HCl concentrado y caliente (HCl cc).

Finalmente, el residuo de P es determinado por medio de digestión ácida con ácido perclórico concentrado (HClO₄ 70%) (ver Figura 1).

En forma general, la secuencia de extracción sería: (i) P inorgánico disponible (extraído con resina y HCO₃); (ii) P inorgánico disponible en forma lenta (extraído con NaOH diluido); (iii) el P orgánico disponible (extraído con HCO₃ y NaOH diluido). Además, la fracción HCl-Pi incluye el P asociado con minerales primarios y secundarios de Ca (O'Halloran, 1986).

* Adaptado de Hedley et al. (1982).

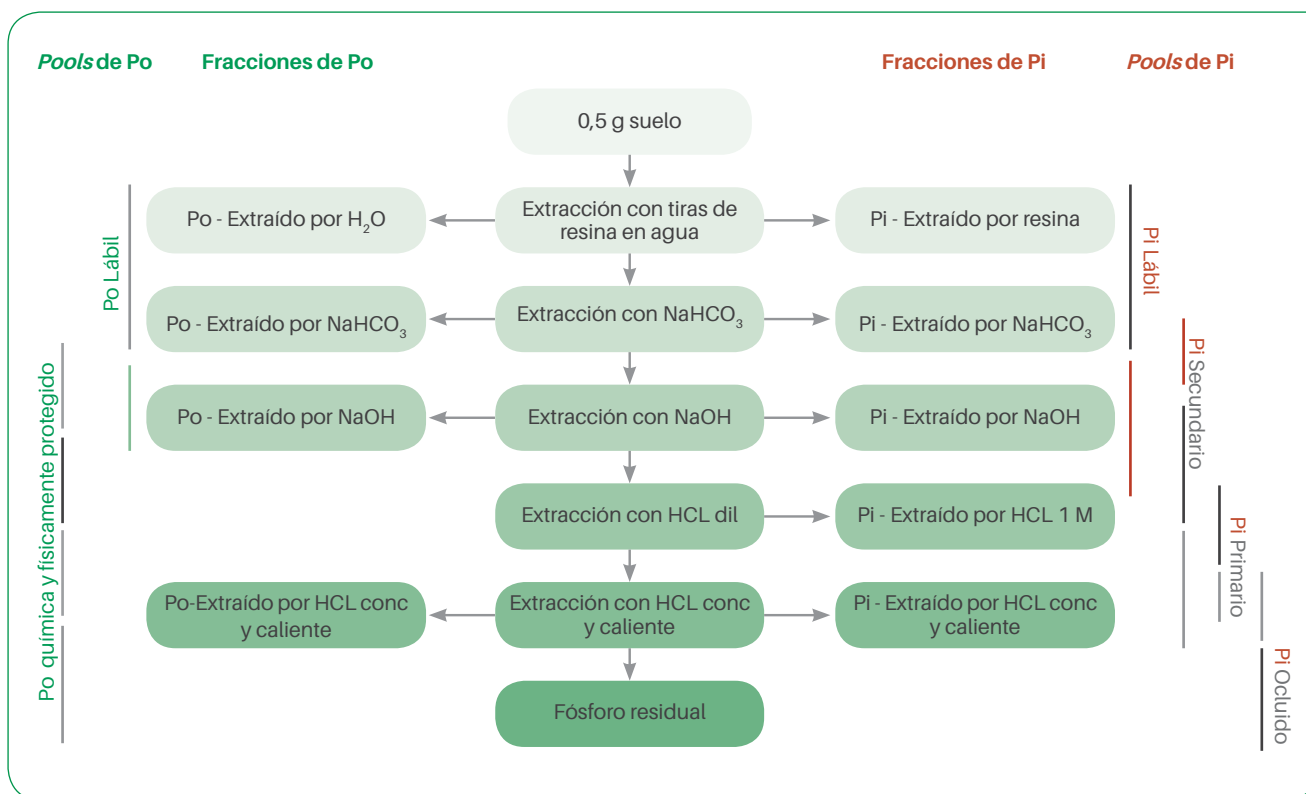


Figura 1. Fracciones de P en el fraccionamiento secuencial y su relación con los *pools*.

La mayor parte de las fracciones extraídas con la resina, al igual que el Pi y Po extraídas con HCO₃, son consideradas como representantes del P disponible para las plantas y los microorganismos.

Como último paso, con HCl concentrado y caliente (Tiessen y Moir, 1993) se extrae la mayor parte del P remanente (cerca del 20 a 60% del Pt) y el Po asociado con las partículas de materia orgánica (Tiessen y Moir, 1993; Oberson et al., 1996). En suelos ácidos no fertilizados con roca fosfórica, la cantidad de P determinado es muy baja.

Finalmente, la parte no disponible y las formas de Pi y Po químicamente estables (ocluídas) se

extraen por oxidación química (digestión con ácido perclórico) del residuo del fraccionamiento (Oberson et al., 1993; Sells et al., 1995).

El P ocluido (escondido) está presente en compuestos de Fe y Al rodeado o recubierto por material inerte. Dicho material, no permite ninguna reacción de este elemento con la solución del suelo. En muchos suelos tropicales, la mayor cantidad de P en forma ocluida se encuentra en concreciones de óxidos de Fe descritos como lateritas (Ahn, 1993).

Para su estudio, se han agrupado las fracciones en los siguientes *pools*:

Pool	Fracciones
Pi- Lábil	Pi- Resina + Pi-HCO ₃ ⁻
Po- Lábil	Po- H ₂ O + Po-HCO ₃ ⁻
Pi- Secundario	Pi- NaOH
Po- Secundario	Po- NaOH
Pi- Ocluido	Pi- HCL dil + Pi-HCL cc + P- Residuo
Po- Protegido	Po- HCL cc

Lábil = disponible; Secundario= formas menos disponibles;
 Estable = Secundario + Ocluido o Protegido; cc= concentrado y caliente

En general, este método de fraccionamiento secuencial más que ser empírico es el más aproximado y exitoso para la estimación de Pi y Po disponibles; aunque la naturaleza de los *pools* de Po extractables aún está muy poco definida con respecto a la del Pi (Tiessen et al., 1993).

En el CIAT, el fraccionamiento se lleva a cabo según los requerimientos y se ha separado en 3 versiones:

- Fraccionamiento completo (incluye todas las fracciones)
- Fraccionamiento reducido (solo fracciones lábiles. Hasta NaOH)
- Fraccionamiento reducido + residuo (fracciones lábiles + fracción de residuo)

El más utilizado e implementado por el Laboratorio del CIAT es el de fraccionamiento reducido + residuo.

Este ha permitido obtener la información de las fracciones lábiles y, de este modo, no se pierden los datos de las no disponibles. Hay que tener en cuenta que las fracciones ácidas (HCl) del fraccionamiento completo, además de no darnos mucha información para este tipo de suelos (oxisoles no fertilizados con roca fosfórica) son muy contaminantes en su procedimiento de extracción.

Esta metodología ha sido probada y descrita para suelos de Carimagua (predio ubicado en Puerto Gaitán, departamento del Meta, en los Llanos Orientales de Colombia) por Astrid Oberson en 1994 en el Laboratorio de Química de Suelos del CIAT. La descripción de la metodología es la que se referencia a continuación.

Materiales

Soluciones extractoras

1. HCl 0,5 M (0,5 N): adicione 82,8 ml HCl conc. para 2 l de H₂O desionizada
2. NaHCO₃ 0,5 M (0,5 N) (pH 8,5): disuelva 84 g NaHCO₃ + 1 g NaOH a 2 l con H₂O
3. NaOH 0,1 M (0,1 N): disuelva 4 g NaOH en 1 l de H₂O
4. HCl 1 M (1 N): adicione 165,6 ml HCl cc para 2 l de H₂O desionizada (HCl 37%)
5. HCl conc. (37,0%) 12,08 M (12,08 N)

- HClO₄ conc. (70%)
- H₂SO₄ conc. [18 M (36 N) 96%]
- p-nitrofenol (C₆H₅NO₃)
- Hoja de resina intercambiadora iónica (BDH # 55164) para cortar en tiras



Reactivos

Reactivo para determinar Pt (digestión ácida)

Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$ 99%)

Ácido sulfúrico H_2SO_4 11 N

Reactivo de desarrollo de color Murphy y Riley (1962) (M + R)

- Heptamolibdato de amonio tetrahidrato 40 g / 1 l H_2O
- Ácido ascórbico 26,4 g / 500 ml H_2O
- Tartrato de antimonio y potasio 1,454 g / 500 ml H_2O
- H_2SO_4 5N (ácido sulfúrico) 278 ml concentrado / 2 l H_2O

Los debe preparar y conservar en la nevera. Antes de mezclar la solución, saque de la nevera los reactivos y espere a que adquieran la temperatura ambiente. Prepare la mezcla cada vez que se requiera (solución recién preparada). Agite la mezcla antes de usarla.

Mezcle los reactivos en la siguiente secuencia:

Para 500 ml de solución: tome 75 ml de solución de molibdato de amonio y adicione 250 ml de H_2SO_4 5 N. Luego, agregue 50 ml de solución de ácido ascórbico (esta solución se tornará amarilla) y, después, 25 ml de solución de tartrato de antimonio y potasio. Para concluir, complete hasta un volumen de 500 ml con agua desionizada. Prepare la cantidad según el número de muestras y tenga en cuenta los puntos de la curva de lectura (hasta 6 puntos desde 0 hasta 50 $\mu g/ml$; eso dependerá del rango de las concentraciones).

Al momento de preparar la solución color, cubra el *beaker* con papel aluminio, ya que la mezcla es sensible a la luz y puede perderse su eficacia. Puede guardarla, bien tapada y en nevera, si la va a usar al día siguiente. No obstante, es mejor prepararla en el momento justo en que la vaya a usar.

Para la precipitación de la materia orgánica y el ajuste de pH prepare:

H_2SO_4 1,8 N (0,9 M) 100 ml H_2SO_4 concentrado en 2 l de H_2O

H_2SO_4 0,5 N (0,25 M) 100 ml H_2SO_4 5 N (2,5 M) en 1 l de H_2O

NaOH 4 N (4 M): Disuelva 160 g de NaOH en 1 l de H_2O

p-nitrofenol ($C_6H_5NO_3$) 0,1% 0,1 g y complete hasta 100 ml con alcohol al 96%

① → ② → ③ → Procedimientos

Procedimientos analíticos

Determinación de P por el método de Murphy y Riley (1962)

Ambas formas, Pi y Po, se determinan en cada etapa del fraccionamiento con el método de Murphy y Riley (1962). Este está basado en la formación del complejo antimonio-fosfo-molibdato de color azul, donde el ácido ascórbico actúa como reductor. Se realizan las lecturas a una longitud de onda de 712 nm en un espectrofotómetro.

Determinación Pi en resinas y extractos ácidos

Este método analítico se usa directamente para determinar P recuperado por la resina y para la determinación de Pi en los dos extractos de HCl. Para ello, tome la alícuota correspondiente en frascos volumétricos de 50 ml. Use 1–2 gotas de paranitrofenol (PNF) como indicador. Si el extracto es ácido, ajuste el pH primero con NaOH 4 M hasta que quede amarillo, luego tórnalo incoloro (ligeramente ácido) con H₂SO₄ 0,25 M (0,5 N). Para extracto alcalino, solo acidifique.

Adicione 8 ml de reactivo de desarrollo de color (M+R), lleve al volumen, agite y lea en el espectrofotómetro a 712 nm después de 10 min (el color es estable por 24 horas).

Determinación de Pi en solución de NaHCO₃ 0,5 M y NaOH 0,1 M. Extractos alcalinos (EPA, 1971)

Pipetee la alícuota correspondiente en tubos de centrifuga de 50 ml (ver alícuotas para los suelos de los Llanos en la Tabla 2).

Acidifique a pH 1,5 y coloque las muestras en la nevera por 30 min. Para acidificar NaHCO₃ 0,5 M, use 6 ml de H₂SO₄ 0,9 M (1,8 N); agréguelo muy lentamente. Para acidificar NaOH 0,1 M, use 1,6 ml de H₂SO₄ 0,9 M (1,8 N). Estos cálculos están basados en alícuotas de 18 ml para bicarbonato y 15 ml para hidróxido. Al variar las alícuotas variarán las cantidades de H₂SO₄ 0,9 M (1,8 N) para ajustar pH.

Centrifugue a 10.000 rpm durante 10 min.

Decante el sobrenadante en frascos volumétricos de 50 ml. Para ello, lave el frasco con un poco de agua acidificada para no disturbar la materia orgánica (2–3 veces).


Ajuste pH y lea el P por el método de Murphy y Riley (1962).

Determinación de Pt en solución de NaHCO₃ 0,5 M y NaOH 0,1 M y HCl concentrado: digestión ácida y adición de persulfato

Pipetee la alícuota correspondiente en frascos volumétricos de 50 ml (ver Tabla 2).

Adicione aproximadamente 0,6 g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈ 99%) (0,8 g para NaOH 0,1 M y 0,43 g para extracto HCl cc) + 1 ml de H₂SO₄ 11 M.

Asegúrese de que todo el persulfato de potasio esté en solución al lavar con agua.

Coloque en un plato caliente (150 °C) hasta que hagan aparición los vapores blancos de la digestión del ácido sulfúrico (aprox. 0,5 ml quedan en el frasco).  Precaución: No dejar quemar la muestra. Deje enfriar y adicione aprox. 10 ml de H₂O. Luego, determine el P de acuerdo al método de Murphy y Riley (1962).

Procedimiento de extracción (metodología completa)

Comentario:

Los volúmenes finales y las determinaciones a analizarse en cada fracción se muestran en la Tabla 1. Las alícuotas tomadas para las determinaciones de Pi y Po se muestran en la Tabla 2. Las condiciones de centrifugación recomendadas son a 10.000 rpm durante 10 min. 20–25 °C. Para Pi, se puede usar menor temperatura (p. ej., 10 °C). Es necesario controlar el peso de los tubos de centrifuga ya que las adiciones de los extractantes se realizan por peso (balanza). Si hay tubos que se salen del promedio, se deben tener en cuenta.



Día 1

Pese los tubos de centrifuga (50 ml) y adicioneles 0,5 g de suelo seco y cernido con un tamiz de 2 mm de diámetro, junto con dos (2) tiras de resina (BDH # 55164 o equivalente cortadas en tiras de 9 x 62 mm y en forma iónica). Adicione 30 ml de agua desionizada y deje en agitación toda la noche (16 h).



Día 2

Retire las resinas y lave. Luego, devuelva la sustancia resultante del lavado al tubo. Coloque las resinas en tubos secos y, en la tarde, adicione 20 ml de HCl 0,5 M, una hora antes de colocar a agitar, para permitir el escape de los vapores. Tápelas con firmeza y colóquelas en el agitador mecánico durante toda la noche. Al día siguiente, determine el P con el método de Murphy y Riley (volumen de 20 ml de extractante HCl 0,5 M para estimar el Pi recuperado por la resina).

Una vez se han lavado las resinas, se pesan de nuevo los tubos con la suspensión de suelo en agua. De este modo, se mide el volumen real del agua y todos se ajustan al mayor peso. Centrifugue durante 10 minutos a 10.000 rpm (temperatura ambiente), filtre con un filtro *milipore* 0,45 μm y lave devolviendo el suelo al tubo (trate de no perder suelo en estos pasos). Para ello, utilice un poco de extractante (NaHCO_3 0,5 M). Recoja el filtrado del agua y tome una alícuota para Pt. (vol. de extracto de agua a calcular). Analice como Pt, pero realmente es el Po el que quedó en el agua después de retirar el Pi con resina.

En la tarde, complete con esta solución (NaHCO_3 0,5 M) hasta un volumen de 30 ml (por peso). Asegúrese de que todo el suelo quede disuelto en la solución; agite toda la noche junto con los tubos que contienen las resinas con HCl 0,5 M.



Día 3

Centrifugue la suspensión de suelo por 10 min a 10.000 rpm. Filtre el extracto de NaHCO_3 a través de un filtro *milipore* 0,45 μm . Lave el suelo que vaya quedando en el filtro y devuélvalo al tubo, haciendo uso de un poco de NaOH 0,1 M como extractante. Recoja el filtrado para determinar Pi y Pt en el extracto de NaHCO_3 . En la tarde, complete hasta un volumen de 30 ml (por peso) con el extracto de NaOH; nuevamente, deje en agitación toda la noche (vol. 30 ml de extractante HCO_3 para determinar Pi y Pt).



Día 4

Al igual que en el día 3, centrifugue la suspensión a 10.000 rpm durante 10 min. Filtre el extracto de NaOH 0,1 M a través de filtro *milipore* 0,45 μm . Lave el suelo que vaya quedando en el filtro y devuélvalo al tubo haciendo uso del siguiente extractante: HCl 1 M. Recoja el filtrado para determinar el Pi y el Pt en el extracto de NaOH. En la tarde, complete hasta un volumen de 30 ml (por peso) con el extracto de HCl 1 M; nuevamente, deje agitando toda la noche. El volumen de 30 ml del extractante NaOH es para determinar el Pi y el Pt).



Día 5

De nuevo, centrifugue la suspensión a 10.000 rpm durante 10 min. Filtre el extracto de HCl 1 M a través de un filtro *milipore* 0,45 μm . En esta ocasión, no es necesario realizar lavados al tubo. Decante suavemente para no perder suelo. Recoja el filtrado para establecer el Pi en el extracto de HCl 1 M. La determinación de Pi en esta fracción puede omitirla para oxisoles no fertilizados con roca fosfórica. (Vol. 30 ml de extractante HCl 1 M para determinar Pi). Los pasos del Día 6 se pueden hacer.

Día 6

Adicione 10 ml de HCl concentrado al suelo remanente, agite y tápelos sin apretar. Coloque a baño María durante 10 min a 80 °C (previo calentamiento). Trabaje en cámara extractora. Luego, remueva y adicione otros 5 ml de HCl conc. y déjelos reposar una hora. Agítelos cada 15 min.

Tápelos bien y centrifugue a 10.000 rpm durante 10 minutos y decante el sobrenadante en frascos volumétricos de 50 ml (filtre con papel *Whatman* No. 5, 40 o 42) . Adicione a los tubos 10 ml de agua, centrifugue de nuevo y adicione al filtrado. Esto se realiza dos veces para que el suelo quede bien lavado. Complete hasta un volumen de 50 ml con agua y trasvase a frascos plásticos. Determine Pi y Pt en este extracto de HCl concentrado [Vol. 10 + 5 ml con extractante HCl cc (concentrado y caliente), complete a 50 ml con agua]. Adicione 10 ml de agua desionizada al suelo, agite hasta disolver el suelo y déjelos en el agitador mecánico toda la noche.

Día 7

Transfiera la suspensión a tubos de digestión (Taylor, 50 ml). Lave muy bien para no perder suelo y trate de usar la mínima cantidad de agua posible. Deje reposar 1 o 2 días para que el suelo decante totalmente. Con mucho cuidado, elimine el agua del sobrenadante con una pipeta pequeña y deje solo un volumen aproximado de 20 ml de suspensión (no disturbar la muestra). Otra opción es filtrar a través de *milipore* 0,45 μm . Para ello, realice los lavados para recuperar el suelo. De usarse esta opción, el tiempo de reposo para decantar no es necesario.

Coloque las muestras en el bloque de digestión para evaporar el agua (100–120 °C). Luego, adicione 10 ml de ácido perclórico (HClO_4 70%). Dígese durante 1 hora a 120 °C y a lo largo de otra hora a 230 °C. Enfríe y complete a volumen (50 ml) con agua desionizada. Filtre (*Whatman* No. 5, 40 o 42) a frascos para tomar alícuota y determinar Pt del residuo (volumen 50 ml de extractante ácido).

Metodología reducida + residuo

Mismos pasos del día 1 al día 3 de la metodología completa con una variante en el Día 4.

Día 4

Centrifugue la suspensión a 10.000 rpm durante 10 min. Filtre el extracto de NaOH 0,1 M a través de filtro *milipore* 0,45 μm . Lave el suelo que vaya quedando en el filtro y devuélvalo al tubo, usando un poco de agua. Recoja el filtrado para determinar Pi y Pt en el extracto de NaOH.

Transfiera la suspensión a los tubos de digestión (Taylor, 50 ml). Lave muy bien para no perder suelo y tratando de usar la mínima cantidad de agua posible (vol. 30 ml de extractante NaOH para determinar Pi y Pt).

Coloque las muestras en el bloque de digestión para evaporar el agua (100–120 °C). Esta etapa toma tiempo, así que esté pendiente de que no se sequen las muestras.

Una vez evaporadas (queda como un lodo) adicione 10 ml de ácido perclórico (HClO_4 70%), y dígese durante 1 hora a 120 °C y durante otra hora a 230 °C. Enfríe y complete hasta un volumen de 50 ml con agua desionizada.

Día 5

Una vez fríos, filtre con papel *Whatman* No. 5, 40 o 42 en frascos plásticos. Tome alícuotas y determine el Pt del residuo (volumen de 50 ml del extractante ácido).

Metodología reducida

En esta metodología, solo se realizan los pasos 1 al 4. Es decir, se deja hasta la fracción NaOH. Estas se asumen como las fracciones disponibles.

Lavado de material

Una vez realizadas las lecturas, las soluciones ya neutralizadas se descartan y se deja correr suficiente agua para diluirlas; de este modo, se evita generar contaminaciones al medio. De ser posible, es mejor recogerlas en frascos plásticos para finalmente entregar a Salud Ocupacional para su descarte.

Para lavar el material de vidrio, prepare una solución ácida al 2%, con H_2SO_4 .

Primero, lave los frascos volumétricos con agua corriente (de la llave); luego, lávelos con solución ácida al 2% y finalmente enjuáguelos con agua desionizada.

Volúmenes finales para cada fracción

Tabla 1. Resumen de volúmenes totales y determinación requerida en cada extracto dentro del fraccionamiento secuencial para P (balones de 50 ml)

Extractante	Volumen total (ml)	Determinaciones
H ₂ O	(Por peso) aprox. 30	Po
Resina	20	Pi
HCO ₃ 0,5 M	30	Pi, Pt
NaOH 0,1 M	30	Pi, Pt
HCL 1M	30	Pi
HCL cc	50	Pi, Pt
Residuo	50	Pt

A continuación, en la Tabla 2 (a,b,c), se muestran los volúmenes de las alícuotas a tomar en 19 diferentes sitios analizados en el Laboratorio de Química de Suelos del CIAT. Este ensayo hizo parte del Proyecto PE-2 entre los años 1994 y 2005.

Tabla 2. Alícuotas a tomar para los diferentes extractantes del fraccionamiento secuencial y tipos de suelos en Colombia, países de América del Sur, América Central y otras partes del mundo

2a Suelos de Colombia

Fracción	Carimagua y Matazul	Quilichao	Popayán	Pescador	Darién	Dagua	Sevilla	Quindío
Po - H ₂ O	25	20	20	20	20	25	20	25
Pi - Resina	20	5	5	20	10	20	10	20
Pi - HCO ₃	18	10	10	10	10	15	10	10
Pt - HCO ₃	9	5	5	5	5	7,5	5	5
Pi - NaOH	15	2	2	2	2	5	2	2
Pt - NaOH	7,5	2	2	2	2	5	2	2
Pi - HCL 1 M	20	-	-	-	-	-	-	-
Pi - HCL cc	7,5	-	-	-	-	-	-	-
Pt - HCL cc	7,5	-	-	-	-	-	-	-
Pt - Residuo	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Volumen de alícuotas en ml.

Información de los suelos:

Carimagua y Matazol: Llanos Orientales de Colombia

Santander de Quilichao, Popayán y Pescador: Departamento del Cauca (laderas)

Darién y Dagua: Zona laderas cordillera Occidental.

Sevilla: Zona laderas cordillera Central

Quindío: Departamento del Quindío (Zona Cafetera - Quimbaya).

Alícuotas a tomar para los diferentes extractantes del fraccionamiento secuencial y para diferentes tipos de suelos

2b Suelos de América del Sur y Central

Fracción	Venezuela	Ecuador	Honduras	Nicaragua	Costa Rica	México
Po - H ₂ O	25	20	20	20-25	20	20
Pi - Resina	20	10	10	10-20	10	10
Pi - HCO ₃	18	10	20	10-15	10	10
Pt - HCO ₃	9	5	10	5-10	5	5
Pi - NaOH	15	2	10	2	2	2
Pt - NaOH	7,5	2	5	2	2	2
Pi - HCL 1 M	-	-	-	-	-	-
Pi - HCL cc	7,5	-	-	-	-	-
Pt - HCL cc	7,5	-	-	-	-	-
Pt - Residuo	1,5	2,5	2,5	2,5	2	2,5

Volumen de alícuotas en ml.

Los espacios vacíos significan que no se realizó esa fracción.

Información de los suelos:

Venezuela, Ecuador, Costa Rica, Nicaragua, Honduras (Quesungual), México (Tapachula y Simojovel).

Alícuotas a tomar para los diferentes extractantes del fraccionamiento secuencial y tipos de suelos

2c Otros suelos

Fracción	Indonesia	Filipinas	África R	África U	Alemania
Po - H ₂ O	20	20	20	20	25
Pi - Resina	10	10	10	3	5
Pi - HCO ₃	10	10	10	3	15
Pt - HCO ₃	5	5	5	5	7,5
Pi - NaOH	2	2	2	0,5	2,5
Pt - NaOH	2	2	2	0,5	1
Pi - HCL 1 M	-	-	-	-	7,5
Pi - HCL cc	-	-	-	-	2,5
Pt - HCL cc	-	-	-	-	1
Pt - Residuo	2,5	2,5	2,5	0,1	2,5

Volumen de alícuotas en ml.

Los espacios vacíos significan que no se realizó esa fracción.

Información de los suelos:

África (Ruanda y Sukulo Uganda), Indonesia (Malang), Filipinas y Alemania (Oxisol fósil con adiciones de P).

Procesamiento de datos

Inicialmente, se grafica la curva para cada extractante y así obtener los resultados en ugP/g.

En un archivo general, una vez agrupados, se procede a realizar las sumatorias para obtener finalmente el % de extracción (P_o extraído/ $\sum P_t$).

Para procesar los datos, se realizan las sumatorias de la siguiente manera:

$$\sum P_o = H_2O-Po + Bic-Po + NaOH-Po + HClcc-Po$$

$$\sum P_t = H_2O-Po + Resin-Pi + Bic-Pt + NaOH-Pt + HCl dil-Pi + HClcc-Pt + Resid-Pt$$

$$\sum P_i = \sum P_t - \sum P_o$$

En el caso de llevar a cabo un fraccionamiento reducido, se sacan de la fórmula las fracciones que no se analicen.

Posteriormente, se procede a realizar el análisis estadístico y a graficar.

Comentarios finales

Este trabajo es el resumen de los análisis químicos de fraccionamiento secuencial de P, montaje realizado por Astrid Oberson asistida por Gonzalo Borrero. Los análisis fueron realizados en el período de 1994 a 2004 en el Laboratorio de Química de Suelos. Se ejecutaron en el marco del proyecto PE-2 dirigido por el Dr. Rao. En la realización de los análisis, colaboró la asistente del laboratorio Marcela Rodríguez. Agradecemos a Astrid Oberson, de ETH Zurich Suiza, por su colaboración, montaje de la técnica y trabajo en el laboratorio (LQS).

Nota:

La metodología de este protocolo ha sido implementada en el Laboratorio de Química de Suelos del CIAT por Astrid Oberson y Gonzalo Borrero desde 1990.

Referencias

- Ahn MP. 1993. Phosphorus, silicon and potassium. Tropical soils and fertilizer use book. Intermediate Tropical Agriculture Series. pp 128-132.
- Borrero G. 1998. Destinos del fósforo aplicado como fertilizante en oxisoles y modelación del valor residual para cultivos (tesis de maestría). Universidad Nacional Palmira, sede Palmira. Palmira, Colombia.
- Gijsman A; Oberson A; Tiessen H; Friesen D. 1996. Limited applicability of the CENTURY model to highly weathered tropical soils. *Agron. J.* 88 (6):894-903.
- Hedley MJ; Stewart J; Chauhan B. 1982a. Changes in inorganic and organic soils phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46:970-976.
- Hedley MJ; White RE; Nye PH. 1982b. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus*, var. Emerald) seedlings. III. Changes in L Value, Soil Phosphate Fractions and Phosphatase Activity. *New Phytol.* 91:45-56.
- Mattingly GEG. 1975. Labile phosphate in Soils. *Soil Sci.* 119: 369-375.
- Murphy J; Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31-36.
- Oberson A. 1996. Sequential P fractionation. Detailed method description for the laboratory of CIAT, based on the results got for soils samples from Carimagua. Tiessen and Moir (1993) with a few modifications. Sin publicar.
- Oberson A; Borrero G. 1990. Metodología implementada en el Laboratorio de Química de Suelos de CIAT. Cali, Colombia: CIAT.
- Oberson A; Besson N; Maire H; Sticher. 1995. Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping system. *Biology and Fertility of Soils* 21:138-148.
- Oberson A; Fardeau J; Besson J; Sticher H. 1996. Soil phosphorus dynamics in cropping systems managed according to conventional and biological agricultural methods. *Biol. Fertil. Soil*, 16:11-117.
- O'Halloran I. 1986. Phosphorus transformations in soil as affected by management (PhD dissertation) Dep. Soil. Sci. University of Saskatchewan. Saskatoon, Canada.
- Schmidt J; Buol S; Kamprath E. 1996. Soil phosphorus dynamics during seventeen years of continuous cultivation: Fractionation Analyses. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60:1168-1172.
- Sells F; Campbell C; Zentner R. 1995. Effect of cropping and fertilization on plant and soil phosphorus. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59:140-144.
- Tiessen H; Moir JO. 1993. Characterization of available P by sequential extraction. En: Carter MR (ed.) *Soil sampling and methods of analysis*. Boca Ratón, Florida, USA: CRC Press Inc. pp. 75-86.
- Tiessen H; Stewart J; Cole C. 1984. Pathways of phosphorus transformations in soil of differing pedogenesis. *Soil Sci. Am. J.* 48:853-858.
- Tiessen H; Stewart J; Moir J. 1993. Changes in organic and inorganic phosphorus composition of two grassland soils and their particle size fractions during 60-90 years of cultivation. *J. Soil Sci.* 34:815-823.
- Williams JDH; Syers JK; Harris RF; Armstrong DE. 1971. Fractionation of inorganic phosphate in calcareous lake sediments. *Soil Sci. Am. J.* 35:250-255.
- Williams JDH; Mayer T; Nriagu JO. 1980. Extractability of phosphorus from phosphate minerals common in soils and sediments. *Soil Sci. Am.* 35:250-255.



CONTACTO

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

g.a.borrero@cgjar.org

Metodología para la evaluación de la compactación de suelo

Introducción

La compactación hace referencia a la reducción del volumen del suelo debido a factores externos. Esta reducción disminuye la productividad del suelo y la calidad ambiental. Su efecto más directo es un incremento en la densidad aparente del suelo. La compactación ocasionada por el uso de maquinaria agrícola es un problema reconocido en la mayoría de áreas agrícolas del mundo (Thung y Rao, 1999; Hanza y Anderson, 2015). Esta genera efectos adversos en numerosas propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, tales como la densidad aparente, la impedancia mecánica, la distribución de la porosidad, la conductividad hidráulica (Radford et al., 2000; Amézquita, 2013), la mineralización y la actividad microbial (Sergio et al., 2011).

Dichos efectos reducen la penetración de las raíces, la extracción del agua y nutrientes por parte de las plantas, lo cual limita su crecimiento (Kirkegaard et al., 1992; Passioura, 2002).

Según los fitomejoradores, el rendimiento potencial de los cultivos podría alcanzarse —en su totalidad— si también fueran adaptados al ambiente fisicoquímico del suelo en el cual se desarrollan (Ocloo et al., 2014). La recuperación de los suelos afectados por compactación, además de requerir tiempo, es costosa. Un manejo alternativo puede

ser la adaptación de genotipos a suelos con algún grado de compactación.

Así, algunos trabajos de fitomejoradores indican que entre diferentes cultivos y cultivares de un mismo cultivo pueden variar los niveles de tolerancia a la compactación.

No obstante, el estudio de tolerancia de cultivos a la compactación del suelo en campo no permite controlar, en su totalidad, los factores ambientales. Además, presenta una amplia variabilidad espacial, lo cual dificulta la interpretación de los resultados. Por lo tanto, gran parte de los estudios de compactación del suelo se llevan a cabo en invernadero. Esto permite reproducir condiciones particulares de compactación en campo y evaluar mayor número de materiales.

1. Método de capas de suelo compactado en cilindros

Este método nos permite: la obtención de diferentes niveles de compactación expresados como densidad aparente de suelo (previamente establecida); el manejo simultáneo de la humedad del suelo y el seguimiento visual del desarrollo de las raíces en tiempo real. Se desarrolló con base en una adaptación del método de evaluación de raíces en invernadero (Polanía et al., 2009). Ver Figuras 1 y 2.



Equipo

- Cilindros de acetato transparente, de 10 cm de diámetro y 80 cm de altura, cerrados en la parte inferior
- Cilindros de PVC de 12 cm de diámetro y 82 cm de altura
- Cilindro PVC de 10 cm de diámetro y 20 cm de altura
- Suelo o mezcla de suelo con humedad equivalente a 80% de capacidad de campo
- Prensa hidráulica (manómetro digital, preferiblemente)

- Láminas de acetato de 20 cm de longitud y 12 cm de ancho
- Balanza electrónica
- Horno 120 ± 5 °C
- *Beakers*
- Palines
- Agua destilada
- Gradillas de maderas o estructuras metálicas

① → ② → ③ → Procedimiento

1. Previamente, estime la densidad aparente (g/cm^3) y el contenido de humedad a capacidad de campo (%), al suelo o la mezcla (suelo + arena).
2. Calcule la cantidad de suelo seco a utilizar, según la densidad aparente establecida para un volumen constante de 785 cm^3 equivalente a una capa de 10 cm de altura.
3. Lleve la cantidad de suelo calculado al 15% de humedad de la capacidad de campo establecida (80%).
4. Introduzca el suelo humedecido en el cilindro de PVC revestido en su interior con una lámina de acetato transparente ($10 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$).
5. Coloque el cilindro de PVC preparado con anterioridad en la prensa hidráulica y ejerza presión (alrededor de 1,4 MPa) hasta compactar el suelo a una altura de 10 cm.
6. Adicione el agua restante para completar el 80% de la humedad a capacidad de campo.
7. Disponga en los cilindros de acetato transparente ($10 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$) el suelo con humedad equivalente a 80% de capacidad de campo hasta una altura de 62 cm.
8. Introduzca en el cilindro anterior la capa de suelo compactado. Además, incluya la lámina de acetato transparente.
9. Completar con suelo (humedad al 80% de la capacidad de campo) hasta 3 cm del borde del cilindro.
10. Coloque los cilindros de acetato dentro de los tubos de PVC ($12 \text{ cm} \times 82 \text{ cm}$).
11. Disponga los cilindros de PVC, en gradillas de madera o estructuras metálicas, en el invernadero.

Determinaciones y cálculos

1. Densidad aparente de suelo (método volumétrico): Con anillos metálicos de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura, tome las muestras de suelo; elimine los sobrantes para garantizar el volumen exacto del cilindro. Tome el peso del suelo después de secarlo durante 48 h a 105 °C en el horno.

Densidad aparente, $\text{g}/\text{cm}^3 = \text{masa de suelo seco, g} / \text{volumen del cilindro, cm}^3$

2. Cantidad de suelo requerido para la capa de suelo compactada: variación de peso de suelo seco en un volumen constante (10 cm de diámetro y 10 cm de altura).

Determine el volumen del cilindro equivalente a la capa de suelo compactada.

$$\text{Volumen del cilindro} = \pi \cdot r^2 \cdot h = 785 \text{ cm}^3$$

Densidad = peso / volumen

Entonces:

Varíe el peso del suelo seco en este volumen fijo. Por ejemplo, para llevar un suelo sin compactar de densidad aparente de $1,2 \text{ g/cm}^3$ a $1,4 \text{ g/cm}^3$ se requiere 1100 g; para uno de densidad aparente de $1,6 \text{ g/cm}^3$ es necesario 1257 g de suelo seco.



Figura 1. Elaboración de la capa de suelo compactada: a) pesaje y humedecimiento del suelo; b) ubicación de la muestra de suelo en molde; c) empuje inicial de la muestra; d) sostenimiento a presión de la muestra con prensa hidráulica.

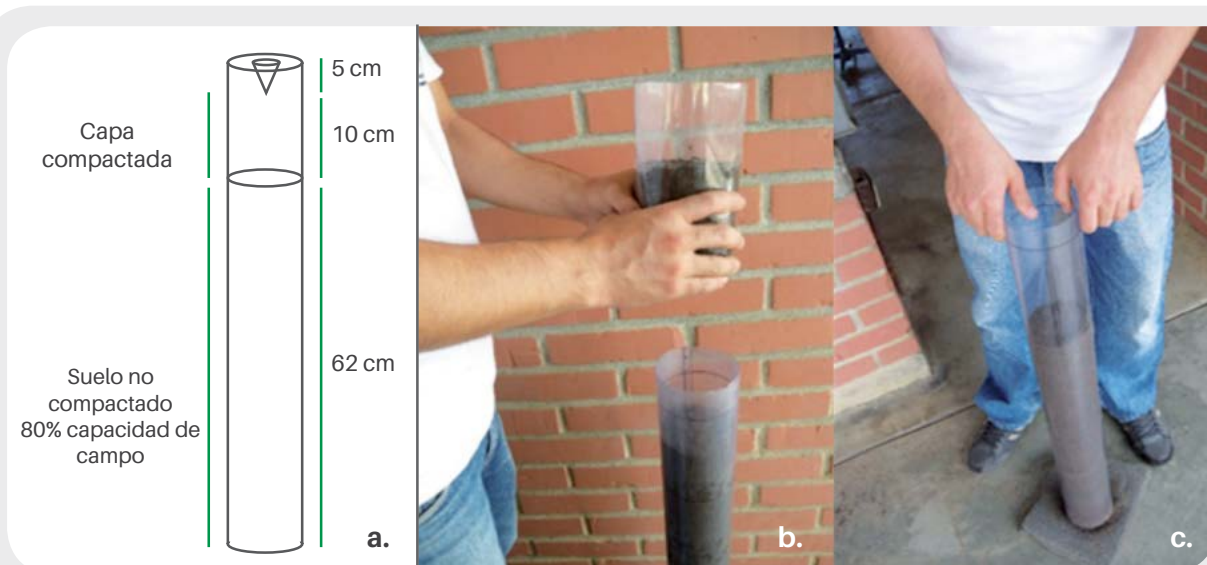


Figura 2. Formación de la unidad experimental : a) diagrama de la distribución del suelo en el cilindro; b) llenado inicial de cilindro con suelo sin compactar; c) colocación de la capa compactada sobre el suelo; d) cubrimiento del cilindro con tubo de PVC; e) distribución en invernadero de los tratamientos en gradillas de madera.

2. Método de discos de parafina en cilindros

El método de los discos de parafina es una adaptación del método propuesto por Yu et al. (1995) para arroz, en combinación con el método de evaluación de raíces en invernadero (Polanía et al., 2009). Para evaluar la habilidad de penetración de raíces en genotipos de frijol, tres proporciones de parafina dura y blanda (80 y 20%), (60 y 40%) y (80 y 20%), respectivamente, fueron mezcladas para obtener discos de parafina con una dureza determinada.

En el frijol, la mezcla que presentó los mejores resultados para la evaluación de habilidad de penetración de raíces fue la proporción de 60% parafina dura y 40% de parafina blanda (método a describir). Ver Figuras 3 y 4.

Equipo

- Cilindros de acetato transparente, de 10 cm de diámetro y 20 cm de altura, cerrados en la parte inferior
- Láminas de cartulina negra (12 cm x 20 cm) para cubrir los cilindros de acetato
- Parafina dura y blanda
- Penetrómetro de bolsillo (minipenetrómetro)
- Balanza electrónica
- Horno 120 ± 5 °C
- *Beakers*
- Molde de acrílico con discos de 9,7 cm de diámetro y 3,6 mm de espesor
- Estufa
- Estructuras en invernadero

Procedimiento

1. Coloque 60% de parafina dura y 40% de parafina blanda en un *beaker*. Caliente sobre una estufa a 80 °C por 15 minutos. Agite permanentemente para lograr una mezcla homogénea.
2. Dispense 30 ml de la mezcla fundida en cada uno de los orificios del molde de acrílico para formar los discos de 3,6 mm de grosor y 9,7 cm de diámetro.
3. Refrigere los discos a 7 °C durante 20 min en una nevera.
4. Tome la resistencia a la penetración de los discos de parafina con el penetrómetro.
5. Introduzca el suelo con humedad equivalente a 80% de capacidad de campo en el cilindro de acetato hasta una altura de 15 cm.
6. Coloque el disco de parafina sobre el suelo húmedo sin compactar.
7. Complete con suelo el cilindro, hasta 1 cm del borde, para facilitar la aplicación de riego.
8. Siembre una semilla pregerminada en el centro del cilindro.
9. Cubra el cilindro con la cartulina negra.
10. Después de la siembra, mantenga el suelo a 80% de la capacidad de campo durante los primeros 10 días, tanto en riego como en sequía, efectúe el pesaje de los cilindros cada dos días.
11. Suspnda el riego en tratamientos de sequía a partir del día 11 después de siembra.
12. Realice la evaluación de conteo de raíces 20 días después de siembra (DDS).

Determinaciones y cálculos

Al cosechar (20 DDS), lave las raíces, cuente el número de raíces totales por planta (No RZTOT) y cuantas atravesaron el disco de parafina (No RZADP). Esto con el fin de determinar la habilidad de penetración de las raíces. Para esto, aplique la siguiente fórmula:

Habilidad de penetración de raíces (%) = (No. RZADP/No. RZTOT) × 100 (Materchera et al., 1992; Nhan et al., 2006). El diámetro de las raíces es determinado a partir del análisis de imágenes con el *Software* WinRHIZO.



Figura 3. Elaboración de discos de parafina: a) calentar a 80 °C de la parafina dura (60%) y blanda (40%) por 15 minutos; d) dispensar la mezcla sobre el molde de los discos; c) refrigerar a 7 °C los discos de parafina durante 20 minutos; d) disco de parafina.

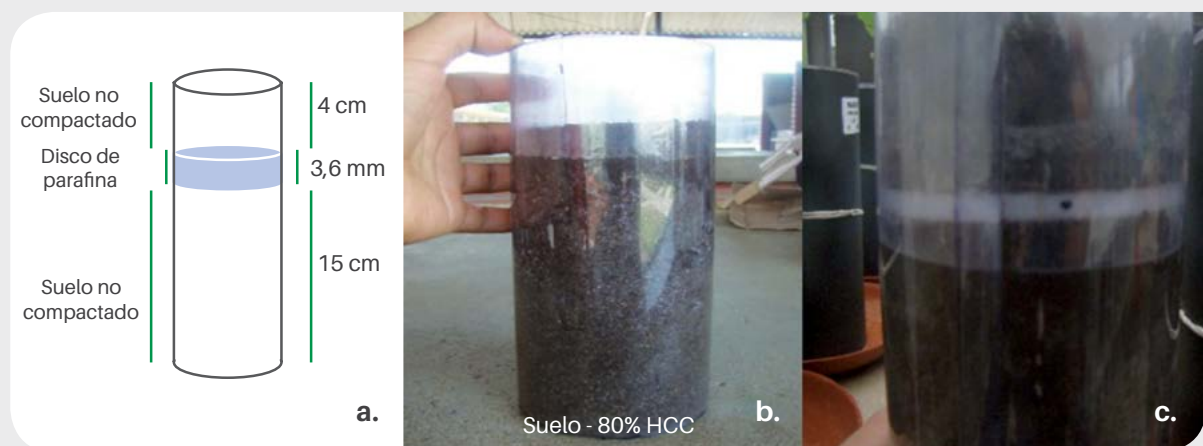


Figura 4. Ensamblaje de la unidad experimental: a) diagrama de la distribución del suelo y el disco de parafina en el cilindro; b) llenado inicial de cilindro con suelo sin compactar; c) colocación del disco de parafina (continúa).



Figura 4. (continuación)
d) cubrimiento del cilindro con cartulina e) distribución de los tratamientos en invernadero.

Nota:

Los responsables de este apartado son Mariela Rivera Peña (CIAT) y Pedro Alexander Velásquez Vasconez (Universidad de Nariño).

 **Referencias**

Amézquita AE. 2013. Propiedades físicas de los suelos de los Llanos Orientales y sus requerimientos de labranza. En: Amézquita E; Rao IM; Rivera M; Corrales I; Bernal J. (Eds.). *Sistemas Agropastoriles: Un enfoque integrado para el manejo sostenible de oxisoles de los Llanos Orientales de Colombia*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp 29-51.

Chimungu JG; Kenneth WL; Lynch JP. 2015. Root anatomical phenes predict root penetration ability and biomechanical properties in maize (*Zea mays*). *Journal of Experimental Botany* 66(11):3151-3162.

Hanza MA; Anderson WK. 2005. Soil compaction in cropping systems: a review of the nature, causes and possible solutions. *Soil Tillage Research* 82:121-45.

Kirkegaard JA; So HB; Troedson RJ. 1992. The effect of soil strength on the growth of pigeon pea radicles and seedlings. *Plant and Soil* 140:74-75.

Materchera SA; Alston AM; Kirby JM; Dexter AR. 1992. Influence of root diameter on the penetration of seminal roots into a compacted subsoil. *Plant and soil* 144:297-303.

Nhan DQ; Thaw S; Matsuo N; Mochizuki T. 2006. Root penetration ability of Vietnamese traditional upland rice varieties. *Journal Faculty of Agriculture, Kyushu University* 51(2):245-249.

Ocloo CY; Quansah C; Logah V; Amegashie VK. 2014. The Impact of different levels of soil compaction on soil physical properties and root growth of maize and soybean seedlings. *West African Journal of Applied Ecology* 22(2):17-30.

Passioura JB. 2002. Soil compactions and plant growth. *Pl. Cell Envir.* 25:311-318.

- Polanía JA; Rao IM; Beebe S; García R. 2009. Desarrollo y distribución de raíces bajo estrés por sequía en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en un sistema de tubos con suelo. *Agronomía Colombiana* 27(1):25-32.
- Radford BJ; Bridge BJ; Davis RJ; McGarry D; Pillai UP; Rickman JF; Walsh PA; Yule DF. 2000. Changes in the properties of a Vertisol and responses of wheat after compaction with harvester traffic. *Soil Tillage Research* 54:155-170.
- Sérgio RS; Ivo RS; Nairam FB; Eduardo SM. 2011. Effect of compaction on microbial activity and carbon and nitrogen transformations in two Oxisols with different mineralogy. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*: 35(4).
- Thung M; Rao IM. 1999. Integrated management of abiotic stresses. En: Singh SP. (Ed.). *Common bean improvement in the twenty-first century*. Kimberly, USA: Kluwer Academic Publishers. pp. 331-370.
- Yu LX; Ray JD; O'Toole JC; Nguyen HT. 1995. Use of wax-petrolatum layers for screening rice root penetration. *Crop Science* 35:684-687.

 CONTACTO

Mariela Rivera Peña

m.rivera@cgjar.org



Capítulo 4

Protocolos para mediciones fisiológicas en material vegetal de frijol

Protocolo para evaluación fenotípica bajo estrés por sequía

Evaluación en campo de atributos aéreos y de raíces

Introducción

Con el fin de establecer diferencias genotípicas del frijol común, en cuanto a la resistencia a la sequía, los ensayos de campo requieren ser realizados durante la temporada seca del año. Estos pueden incluir accesiones de germoplasma, líneas mejoradas y líneas recombinantes. Para ello, es necesario asignar dos niveles de suministro de agua: el primero, irrigado para no ocasionar estrés; el segundo, sin riego (solo ambiente) para generar estrés por sequía con el objetivo de cuantificar los efectos de su intensidad y duración sobre el crecimiento del cultivo y el rendimiento de grano. Para esto, es necesario monitorear durante el tiempo de crecimiento del cultivo el contenido de agua en el suelo y los

parámetros climáticos (precipitación, temperatura máxima, mínima y media, humedad relativa, evaporación potencial y radiación solar). Estas medidas permitirán la cuantificación del grado de estrés por sequía en diferentes etapas de crecimiento.

Diseño experimental

Según el número de genotipos a ser evaluados, los ensayos se establecen en diseños de *lattice* (4 x 5, 6 x 5 o 11 x 10, 4 x 4, 5 x 5 o 6 x 6) con tres repeticiones en cada tratamiento. Los genotipos en los ensayos pueden ser sembrados en surcos; cada repetición puede estar representada por 2 surcos por genotipo (o 4 para ensayos pequeños) de

3,72 m de longitud con una distancia entre surcos de 0,6 m y un espaciamiento entre plantas de 0,075 m (15 semillas por 1 m de longitud del surco para tener un número final de 10 a 15 plantas por metro) (Figura 1).

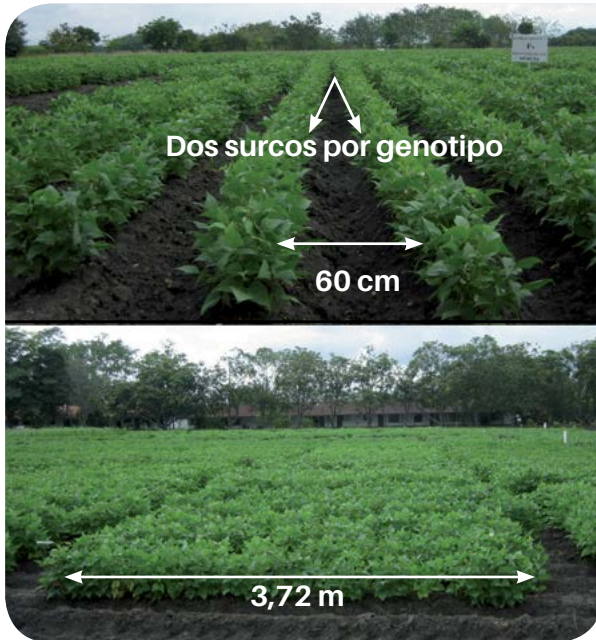


Figura 1. Longitud del surco y distancia entre surcos usada en ensayos de campo en las instalaciones del CIAT en Palmira.

Monitoreo de condiciones climáticas

Los parámetros climáticos diarios (precipitación diaria, temperatura mínima y máxima, humedad relativa y evaporación potencial entre otros) requieren ser registrados por una estación climatológica automática (p. ej., *WatchDog 2475 Plant Growth Station, Davis advantage Pro2 Weather Station Series 6162C, Davis Instruments*).

A través del tiempo, estas medidas climatológicas y los contenidos de agua en el suelo son parámetros útiles para determinar el tipo de sequía que se presentó durante el desarrollo y crecimiento del cultivo (Figura 2). A su vez, permiten identificar los genotipos de frijol resistentes a estos tipos de estrés por sequía, y que después alcanzarán la madurez y floración.

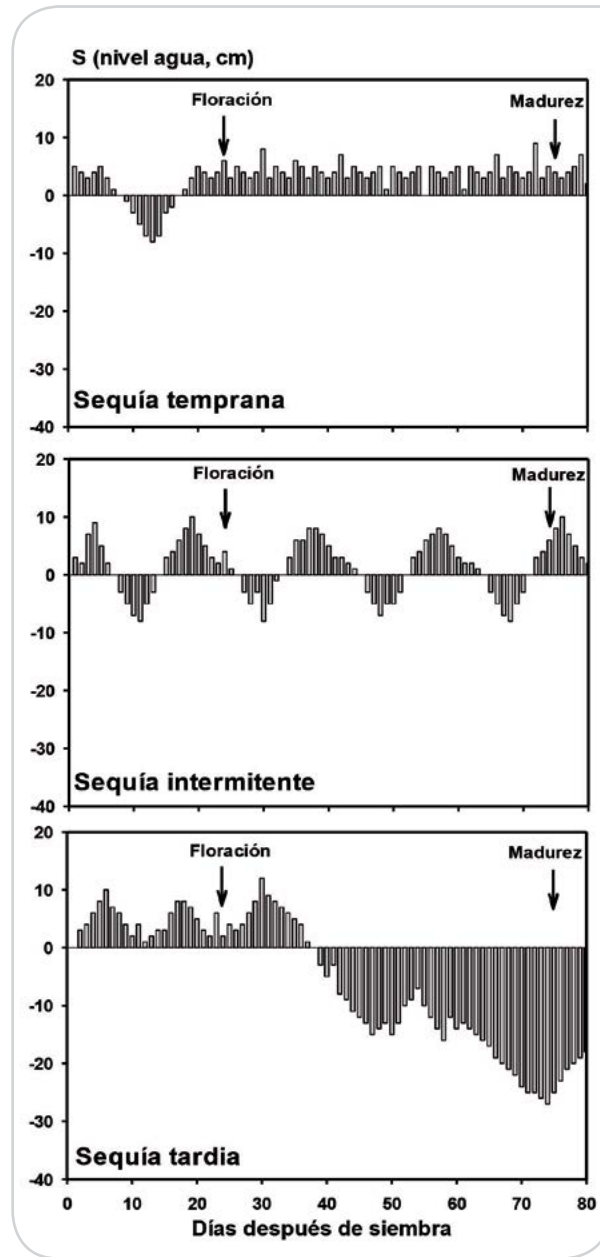


Figura 2. Tipos de estrés por sequía (Fischer et al., 2003).

Inducción de estrés por sequía

Según la precipitación, es necesario aplicar de 2 a 3 riegos por gravedad o algún otro sistema de riego (alrededor de 35 mm en cada uno) para asegurar un buen establecimiento del cultivo. La distribución de estos riegos en sequía es la siguiente: un primer riego de siembra aplicado 4 días antes de siembra; el segundo, a los 10 o 12 días después de la siembra y el tercero, máximo 25 días posteriores a

la siembra. El tratamiento de control requiere de riegos adicionales (4 a 5); esto dependerá de la precipitación. Es relevante llevar a cabo un monitoreo de la cantidad de agua aplicada (p. ej., 35 a 50 mm de agua) por cada riego.

Con el objetivo de monitorear el nivel de humedad en el suelo y determinar la intensidad del estrés por sequía, se requiere establecer el contenido de humedad gravimétrica en el suelo. Para esto, se toman muestras de suelo con un barreno hasta los 80 cm de profundidad: las muestras estratificadas

se extraen a las siguientes profundidades (0–5, 5–10, 10–20, 20–40, 40–60 y 60–80 cm). El suelo es muestreado con un volumen conocido (cilindros de 5 cm alto x 5 cm de diámetro) a cada profundidad, este es inmediatamente pesado (peso húmedo) y luego secado en un horno a 105 °C hasta obtener un peso constante (entre 24–48 horas). Con los datos anteriores, se puede determinar el contenido gravimétrico de la humedad en el suelo (%) y densidad aparente (g cm^{-3}) (Figura 3).



Figura 3. Muestreo de suelo y determinación de peso seco.

Contenido gravimétrico de agua (%), $\Theta_m = M_a * 100 / M_s$

M_a = peso del agua en la muestra, g

M_s = peso del suelo seco, g

Densidad aparente (g cm^{-3}), $D_a = M_s / V_b$

M_s = peso del suelo seco, g

V_b = volumen de la muestra de suelo, cm^3

Para la estimación del contenido de humedad en el suelo, existen varios equipos disponibles en el mercado como el *Watermark-Irrrometer* (Figura 4A) y el *PR2 Soil Moisture Profile Probe* de *Delta-T Devices*. Con relación al primero, el sensor de *Watermark* es de matriz granular y se convierte en

un método indirecto, calibrado, que mide el contenido de humedad en el suelo. Este usa un tipo de sensor de resistencia eléctrica, el cual es leído por un dispositivo lector (*Data Logger*) que convierte las medidas de resistencia eléctrica en lecturas calibradas de tensión de agua en KPa. Estos sensores deben ser instalados en sitios estratégicos en el ensayo —tanto en condiciones de riego como de sequía— y posicionados en diferentes profundidades del suelo (0–10, 10–20, 20–40 y 40–60 cm). Las lecturas del contenido de humedad se pueden registrar diariamente desde el momento de instalación de los sensores hasta el tiempo de cosecha de grano.

En el caso del PR2 *Soil Moisture Profile Probe* de Delta-T Devices, consiste en una sonda rígida de 1 m de longitud que al ser introducida en tubos de policarbonato, previamente instalados en el campo, permite de forma instantánea medir el contenido de humedad del suelo (humedad volumétrica) en diferentes estratos hasta 1 m de profundidad.

Complementario a la determinación de humedad en el suelo, la variación en la evapotranspiración por el cultivo de frijol debe ser monitoreada con la ayuda de un equipo llamado *ET-Gage* (Figura 4B). Este instrumento es útil para monitorear el uso de agua

por el cultivo durante su crecimiento y desarrollo. Además, muestra la cantidad de agua que está siendo usada a través de la evapotranspiración. Este equipo cuenta con una cerámica de evaporación, en la parte superior, la cual responde a las condiciones ambientales y al sol de la misma manera que las plantas lo hacen; por lo tanto, cuando el agua en el reservorio disminuye, estos cambios son cuantificados en un tubo pequeño medidor que tiene el equipo (los registros de agua evapotranspirada son llevados a diario).

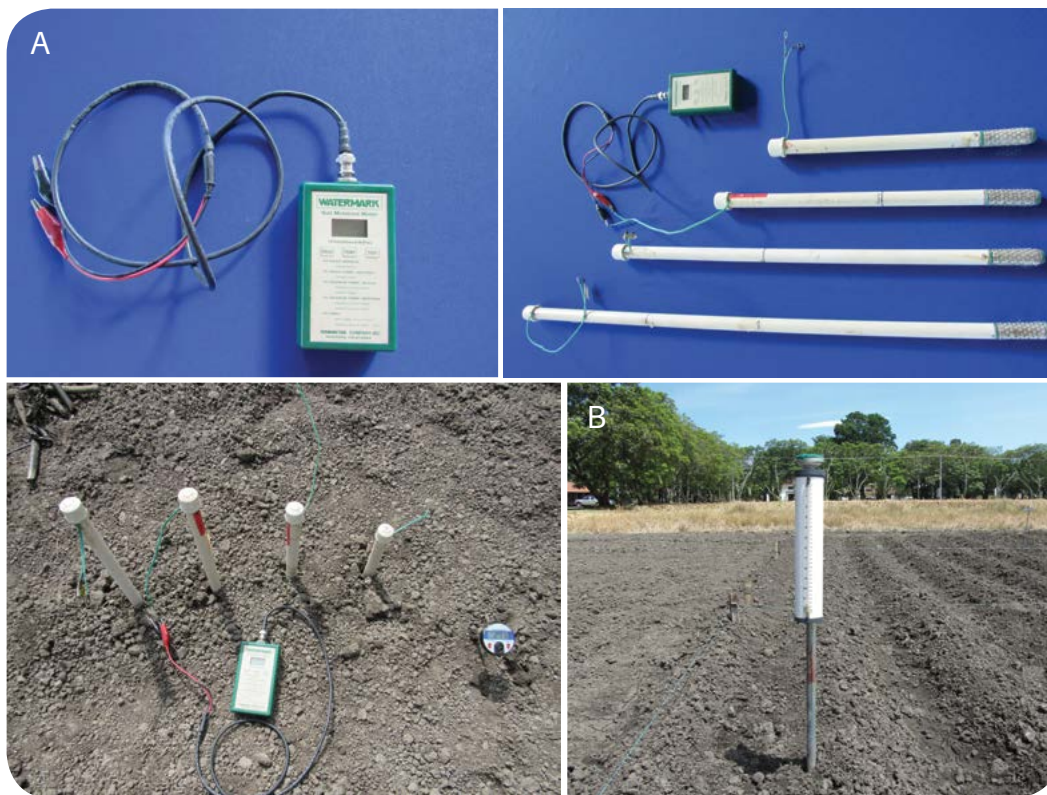


Figura 4. Watermark-irrometer (A) y ET-gage (B). Instalación en campo de los equipos para determinar el contenido de humedad en el suelo y evapotranspiración.

Detalles de muestreo

Los parámetros fenológicos del cultivo, como los días a floración y los días a madurez, son de gran importancia y requieren ser registrados. Asimismo, un número determinado de características de la planta son medidas al alcanzarse el llenado medio de las vainas, tanto en riego como en sequía, con el objetivo de establecer la variación genotípica en cuanto a su resistencia a la sequía. Estas características de la planta incluyen lecturas del

valor de clorofila SPAD en la hoja (en unidades SPAD, *Soil Plant Analysis Development*), eficiencia fotosintética, conductancia estomática, temperatura del follaje, depresión de temperatura del follaje, índice de área foliar, biomasa del cultivo y distribución de biomasa en las diferentes estructuras de la planta, contenido y absorción de nutrientes en la parte aérea y contenido de carbohidratos totales no estructurales (CNTE).

Lecturas del valor de clorofila SPAD en la hoja (SPAD)

Este valor es estimado con un medidor de clorofila de mano no destructivo (SPAD-502 *Chlorophyll Meter*, Minolta Camera Co., Ltd., Japón). Este equipo determina la cantidad relativa de clorofila presente en la hoja mediante la medición de la absorción de la hoja en dos rangos de longitudes de onda. La clorofila tiene picos de absorción en las regiones de azul (400-500 nm) y rojo (600-700 nm), sin transmitancia en la región cercana a la infrarroja. El SPAD-502 mide la absorbancia de la hoja en las regiones rojo y cercana a infrarrojo; con esas dos transmitancias, el medidor calcula un valor numérico SPAD en un rango de 0 a 80, el cual es proporcional a la cantidad de clorofila en la hoja.

El valor de SPAD es medido sobre la hoja joven completamente expandida de una planta por cada repetición (Figura 5).

Temperatura del follaje

La temperatura es determinada con la ayuda de un termómetro infrarrojo (p. ej., *Telatemp model AG-42D*, *Telatemp CA*, USA; o algún otro modelo de termómetro disponible), el cual es sostenido a 50 cm desde la superficie del cultivo formando un ángulo de 45° (Figura 5); el mismo termómetro mide la diferencia entre la temperatura del cultivo y la temperatura del aire alrededor (depresión de temperatura del follaje). En modelos que no cuenten con esta opción, es necesario registrar la temperatura del ambiente para poder calcular de diferencia entre las temperaturas.



Figura 5. Medición del contenido de clorofila en una hoja joven completamente expandida (medidor SPAD - 502) y de la temperatura del follaje con termómetro infrarrojo (Telatemp modelo AG-42D) bajo condiciones de campo.

Conductancia estomática

Esta conductancia es una medida de la apertura de los estomas. Es realizada en una hoja joven completamente expandida usando un porómetro SC1 Decagon. Este instrumento mide la conductividad estomática de las hojas al usar la técnica del estado estacionario. Esta técnica mide la presión y flujo de vapor sobre la superficie de la hoja. La pinza del porómetro tiene incorporada una cámara con un recorrido de difusión conocida. Al fijarse sobre la superficie de las hojas, empieza a

medir la presión de vapor entre dos puntos de esta trayectoria; así se calcula el flujo y el gradiente con las medidas de presión de vapor y conductancia de difusión conocida. Este parámetro es determinado en la etapa de floración, a la mitad de llenado de las vainas, antes y después de la inducción de estrés o en los determinados por el investigador. El porómetro SC1 es distribuido por Decagon Devices, Inc (www.decagon.com).

Eficiencia fotosintética

Las eficiencias máxima y operativa del fotosistema II (PSII) representan la capacidad de energía de los fotones absorbidos por este para ser utilizados en la fotoquímica. Su eficiencia en hojas adaptadas a la luz (F_v'/F_m') es estimada con un equipo (*FLUORPEN* FP100) en la hoja joven completamente expandida. Este equipo proporciona una medida de rendimiento cuántico real o efectivo (F_v'/F_m') cuya relación es una estimación de la proporción efectiva de cuántos de los fotones absorbidos son utilizados en los centros de reacción PSII. Este parámetro puede ser determinado durante el tiempo de floración, a la mitad del llenado de las vainas, antes y después de la inducción de estrés o los determinados por el investigador. El *fluorpen-handheld chlorophyll*

fluorometer es distribuido por la compañía *Qubit Systems* (www.qubitsystems.com).

Para cuantificar algunas de las diferencias fenotípicas en las plantas, en la resistencia en el período de sequía durante el llenado medio de las vainas (entre 45 a 55 días después de siembra), estas pueden ser determinadas mediante muestreos destructivos. Para determinar estas diferencias, los especímenes vegetales son seleccionados y cada repetición a una longitud de surco de 0,5 m lineales (0,3 m²). En esta área, son cortados a nivel del suelo, contados (se asigna un número cada 0,5 m), puestos en una bolsa plástica y transportados a la estación de trabajo para ser procesados (Figura 6).



Figura 6. Muestreo destructivo (50 cm de longitud del surco) durante la mitad del llenado de las vainas para cuantificar diferencias fenotípicas a través de genotipos.

Las plantas son separadas en sus diferentes estructuras: hojas (sin pecíolos); tallos y remanente (vainas y estructuras reproductivas) (Figura 7). Si se cuenta con un medidor de área foliar (p. ej., LICOR modelo LI-3000) se puede determinar el área foliar (Figura 8). Las diferentes estructuras de la planta necesitan ponerse por separado en bolsas de papel para secado en horno a 60 °C durante dos días

(Figura 7). Después del secado de las muestras, el peso seco de cada muestra es registrado (Figura 8).

Con estos pesos, se puede cuantificar producción total de la biomasa (del cultivo) y su distribución en las diversas estructuras de la planta (hojas, tallos, vaina) durante la mitad del llenado de las vainas.



Figura 7. Separación de las hojas, los tallos y las vainas; empaque en bolsas de papel y secado.



Figura 8. Determinación de área foliar, de pesos secos de hojas y vainas después de 48 horas de secado en horno.

Con el fin de estimar la absorción de nutrientes en la parte aérea (N, P, K, Ca y Mg); el contenido de ceniza; de CTNE (carbohidratos totales no estructurales) y llevar a cabo la discriminación del isótopo de carbono, debe ser seleccionada una planta adicional por cada unidad experimental (durante la fase del llenado medio de las vainas) para muestreo destructivo (Figura 9). La planta es cortada a nivel del suelo y puesta en una bolsa de papel para ser transportada al laboratorio. El espécimen vegetal es lavado con agua desionizada y colocado nuevamente en una bolsa de papel para secar en horno a 60 °C por dos días (si se requiere determinar contenido de nutrientes por estructura, esta es separada antes de ser puesta en el horno). Después del secado, la planta es molida y la muestra empacada en tubos de vidrio; luego, será enviada al laboratorio para análisis (Figura 9). La concentración de CTNE en las diferentes estructuras es determinada con NaOH como medio de extracción y antrona como reactivo. La absorbancia de la solución es medida con un espectrofotómetro a

620 nm y la concentración de CTNE es definida al compararla con la glucosa estándar [adaptado de Kand and Brink (1995)]. (Ver protocolo de CTNE en página 24).

Para el análisis de discriminación del isótopo de C (CID), las muestras de la parte aérea de la planta son molidas finamente. Luego, son empacadas en cápsulas de estaño (alrededor de 2,5 mg) y enviadas al laboratorio de isótopos estable de U.C. Davis USA. CID ($\Delta^{13}\text{C}$ in ‰). Este es calculado de acuerdo a la siguiente ecuación, donde $\delta^{13}\text{C}_s$ y $\delta^{13}\text{C}_a$ son las concentraciones de ^{13}C en la muestra y en la atmósfera respectivamente; la composición de ^{13}C de la atmósfera es asumida como $-8,0\text{‰}$ (Farquhar et al., 1989). La discriminación isotópica entre ^{13}C y ^{12}C (Δ) está relacionada con un uso eficiente del agua en toda la planta (Farquhar et al., 1989). Además, permite diferenciar los genotipos por su uso del agua (ahorrador o gastador) y la respuesta al estrés por sequía (Polanía et al., 2016B).

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{CID}) = \frac{([\delta^{13}\text{C}_a - \delta^{13}\text{C}_s])}{([1 + (\delta^{13}\text{C}_s/1000)])}$$



Figura 9. Corte, lavado, secado y molición de la planta adicional para el análisis de nutrientes.

Para determinar las diferencias en el crecimiento y desarrollo de las raíces a través del perfil del suelo, las muestras de estas se toman en la fase del llenado medio de las vainas en los dos tratamientos de suministro de agua (riego y sequía). Las muestras son tomadas a 5 profundidades del suelo (0-5, 5-10, 10-20, 20-40 y 40-60 cm) con un barreno de 5 cm de diámetro. Por cada repetición, se realizan 5 muestras de barrenos, tres de estas entre los surcos y dos en estos (Figura 10). Por cada unidad experimental, las muestras de la misma profundidad son depositadas en la misma bolsa plástica y transportada a la estación para procesamiento. Para facilitar el lavado, son agitadas por 30 minutos en una solución de 5% de hexametáfosfato de sodio. El suelo y las raíces son separados mediante lavado a mano, y, posteriormente, las raíces son separadas de materia orgánica y escaneadas (Figura 11). Las imágenes obtenidas son analizadas con WinRHIZO y así se establece la longitud y diámetro promedio de estas. Después de que las raíces son escaneadas, se colocan en bolsas de papel para secado en horno a 60 °C por 2 días y se determina su peso seco.

Las diferencias en el enraizamiento a través de los genotipos pueden ser estimadas con un modelo de distribución de raíces vertical desarrollado por Gale y Grigal (1987), el cual está basado en la siguiente ecuación:

$$Y = 1 - \beta^d$$

Donde Y es igual a la fracción de biomasa acumulada o la longitud de las raíces (una proporción entre 0 y 1) desde la superficie del suelo a una profundidad (d) en centímetros, y β es el "coeficiente de extinción". β es el único parámetro estimado en el modelo y provee un índice simple numérico de la distribución de la biomasa o la longitud de raíces, donde altos valores de β (p. ej., 0,98) corresponden a grandes proporciones de biomasa o longitud de raíces en lo profundo del suelo, y bajos valores de β (p. ej., 0,91) significan proporciones grandes de biomasa o longitud de raíces cerca de la superficie del suelo.



Figura 10. Muestreo de raíces en campo: se toman cinco muestras con barreno, tres entre los surcos y dos en los surcos. Muestras de raíces son tomadas en 5 profundidades (0-5, 5-10, 10-20, 20-40 y 40-60 cm) con un barreno de 5 cm de diámetro y colectadas en bolsas plásticas.

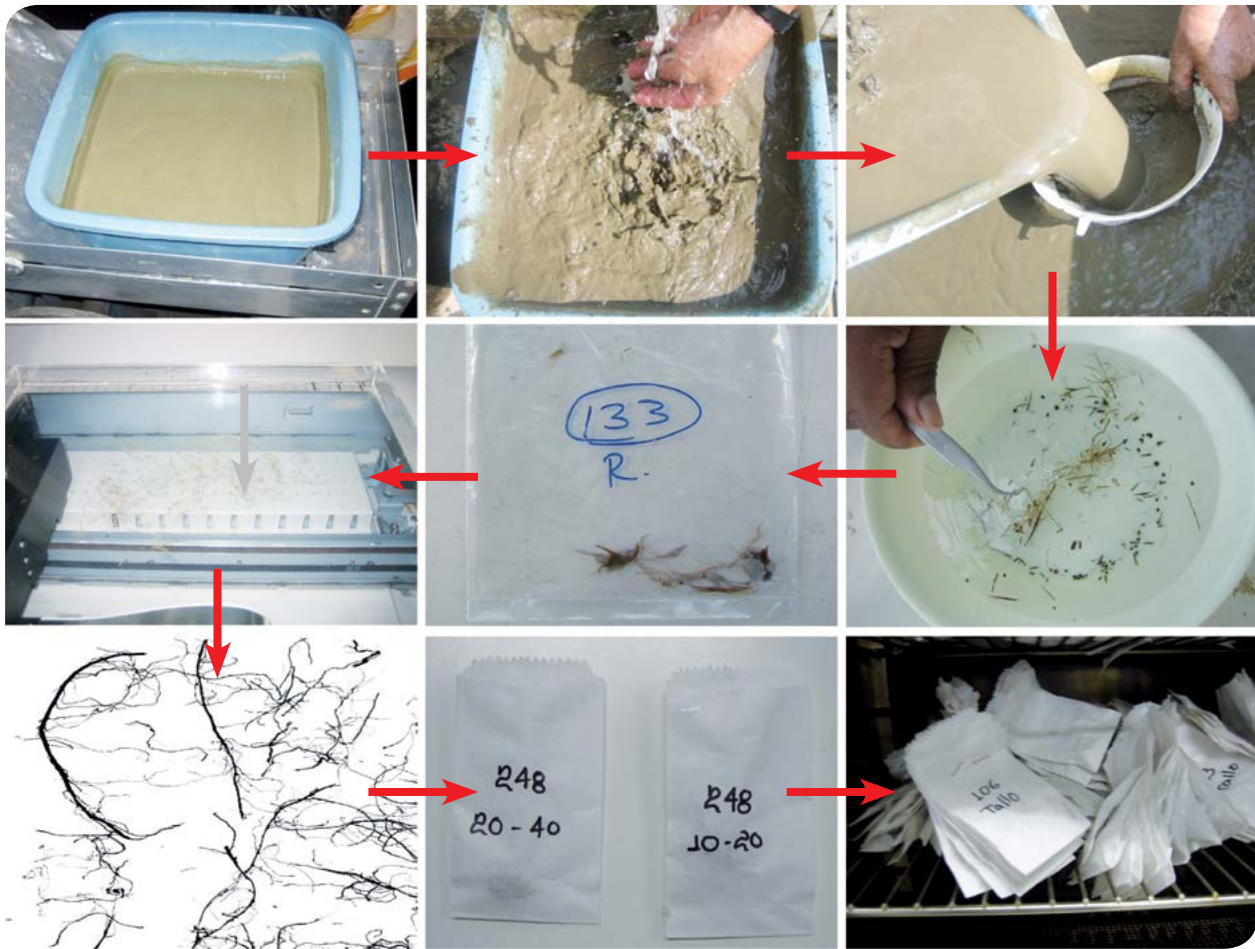


Figura 11. Agitación de las muestras con hexametáfosfato de sodio; lavado, limpieza, escaneado y secado de la muestras de raíces colectadas en campo.

Para determinar otras características de la planta y componentes de rendimiento en tiempo de cosecha, un número de plantas son, de nuevo, seleccionadas, contadas y cortadas a nivel de la superficie del suelo a 0,5 m longitud de surco (área 0,3 m²). Estas son puestas en una bolsa de papel y transportadas a la estación de trabajo.

Las plantas son separadas en tallos y vainas (estas últimas en cáscara y semillas); después, se cuenta el número de vainas y el número de semillas por el área cosechada. Estas muestras son secadas en horno a 60 °C por 2 días y los pesos secos son registrados (Figura 12). El restante de los dos surcos es cosechado para estimar el rendimiento del grano, el peso seco de 100 semillas y la humedad del grano.

Con el fin de establecer el contenido de nutrientes en la semilla (N, P, K, Ca y Mg), ceniza, CTNE y discriminar el isótopo de carbono a partir de los granos, las semillas son secadas al horno, se registra su peso seco y se muelen. La muestra es empacada en tubo de vidrio y enviada al laboratorio para análisis.

Para la discriminación del isótopo de carbono en el grano, se sigue el mismo procedimiento descrito para muestras de la parte aérea. Estas son enviadas al laboratorio de Isótopos Estables en UC Davis USA.



Figura 12. Muestreo destructivo de 50 cm de longitud de surco en tiempo de cosecha, separación de partes de la planta, secado y registro de pesos secos

Atributos de la planta para evaluar adaptación a sequía

Según lo descrito en el anterior protocolo, es posible cuantificar los atributos que a continuación serán detallados. Estos están basados en la información bibliográfica referente al tema (Beebe et al., 2013; Rao et al., 2013; Polanía et al., 2016A).

Índice de intensidad de sequía (DII)

El DII (por sus siglas en inglés) para cada ensayo puede ser calculado a partir de la fórmula siguiente:

$$DII = 1 - Xs/Xr$$

donde Xs y Xr es la media de todos los genotipos bajo tratamientos de sequía (s) y riego (r) respectivamente.

Índice de susceptibilidad a sequía (DSI) para rendimiento de grano

El DSI (por sus siglas en inglés) para cada genotipo es calculado a partir de la fórmula siguiente:

$$DSI = (1 - Ys/Yr)/DII$$

donde Ys y Yr son las medias respectivas de cada genotipo en condiciones de sequía y riego (Fisher y Maurer, 1978).

Rendimiento de grano

Para estimarlo, se pesa la semilla y se registra el contenido de humedad. El rendimiento es expresado en kg/ha y ajustado al 14% del contenido de humedad en el grano.

Media geométrica (GM)

La GM (por sus siglas en inglés) estimada para rendimiento del grano es el resultado del producto del peso de 100 semillas por los días a madurez:

$$MG = (r \times s)^{1/2}$$

Índice de cosecha (HI)

El HI (por sus siglas en inglés) por cada repetición para cada genotipo es calculado según el cociente del peso seco de las semillas en cosecha / peso seco de biomasa aérea (hojas + tallos + vainas) durante el llenado medio de las vainas x 100.

Índice de particionamiento de vaina (PPI)

Este es determinado, por cada repetición para cada genotipo, a partir del cociente del peso seco de vainas en cosecha / peso seco de biomasa aérea

(hojas + tallos + vainas) durante el llenado medio de las vainas x 100.

Índice de cosecha de vaina (PHI)

El PHI (por sus siglas en inglés) es calculado, por cada repetición para cada genotipo, según el cociente del peso seco de semilla en cosecha/ peso seco de vainas en cosecha x 100.

Índice de llenado de grano (GFI)

El GFI (por sus siglas en inglés) para cada genotipo es estimado a partir del cociente del peso de 100 semillas bajo condiciones de sequía / peso de 100 semillas bajo condiciones de riego x 100.

Proporción de biomasa de cáscara (PWB)

Este atributo para cada genotipo puede ser estimado mediante el cociente del peso seco de cáscara / peso seco de vaina en cosecha x 100.

Reducción de biomasa de tallo (SBR)

Este es calculado para cada genotipo a partir del peso seco del tallo durante la mitad del llenado de las vainas—peso seco del tallo en cosecha / peso seco del tallo en mitad del llenado de las vainas x 100.

Eficiencia producción rendimiento (g g⁻¹)

Es determinado por peso seco de semillas en cosecha / peso seco de biomasa aérea (hojas + tallos + vainas) en mitad de llenado de vainas (adaptado de Board and Maricherla, 2008).

Eficiencia producción semilla (No. g-1)

Es estimado a partir del valor que resulta del cociente entre el número de semilla por área/ peso seco de biomasa aérea (hojas + tallos + vainas) durante el llenado medio de las vainas (adaptado de Board and Maricherla, 2008).

Eficiencia producción de vainas (No. g-1)

Se obtiene de la relación entre el número de vainas por área/ peso seco de biomasa aérea (hojas + tallos + vainas) durante el llenado medio de las vainas (adaptado de Board and Maricherla, 2008).

Análisis estadístico

El análisis de varianza es calculado con el programa computacional SAS (SAS/STAT, 2001), donde una probabilidad en el nivel de 0,05 es considerada estadísticamente significativa.

Evaluación en invernadero para el desarrollo de raíces

Suelo

Para esta evaluación, el suelo es colectado de un sitio de interés según el tipo de evaluación a realizar. Este es homogenizado, molido, tamizado y mezclado con arena de río en una proporción de suelo-arena (2:1) conforme al peso (Figura 13). La presencia de arena agiliza el tratamiento de sequía y mejora las condiciones físicas del suelo. La mezcla de suelo-arena es fertilizada con un nivel de nutrientes adecuado (kg/ha de 80 N, 50 P, 100 K, 101 Ca, 29,4 Mg, 20 S, 2 Zn, 2 Cu, 0,1 B y 0,1 Mo) (Tabla 1). Para ello, se usan fuentes diversas de estos y se mezcla con la ayuda de un mezclador (Figura 13).

Con respecto al sistema de tubos suelo, este incluye cilindros plásticos pequeños (transparentes) de 80 cm longitud y 8 cm de diámetro. Estos son insertados dentro de tubos de PVC (Figura 14). Todos los cilindros son llenados con la misma

cantidad de mezcla de suelo – arena. Según el tipo y la densidad aparente del suelo, esta cantidad puede ser entre de 4 a 6 kg de la mezcla. Con cuidado, los cilindros son colmados hasta los 75 cm de altura del cilindro con la cantidad de suelo pesada de manera adecuada (Figura 14). Después de llenar el cilindro, a este se le aplica agua (suavemente) hasta llegar al 80% de capacidad de campo la cual ha sido determinada previamente. Las semillas son esterilizadas usando una solución de hipoclorito de calcio al 5% por 5 min. Luego, se ponen a germinar en el sistema de sánduche (papel de germinación, en medio de espuma retenedora de humedad). Después de 48 horas, las semillas de raíz pequeña son trasplantadas a los cilindros; cada semilla germinada es colocada en el centro del cilindro (Figura 14).

Tabla 1. Fuente de los nutrientes para fertilizar el suelo.

Fuente	Nutriente	Nutriente Contenido %	Nutriente por ha (Kg/ha)
Urea	N	46,0	60,0
DAP	P	46,0	50,0
	N	18,0	19,6
KCl	K	52,0	100,0
Cal dolomítica	Ca	22,0	90,0
	Mg	9,8	60,0
Flor de azufre	S	86,0	40,1
ZnCl ₂	Zn	47,0	20,0
CuCl ₂ 2H ₂ O	Cu	37,1	2,0
H ₃ BO ₃	B	17,4	0,1
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	Mo	39,4	0,1



Figura 13. Proceso de homogenización, molienda, tamizado y fertilización del suelo para el llenado de cilindros.



Figura 14. Metodología para llenar cilindros con la mezcla de suelo - arena, germinación de semillas y trasplante a los cilindros.

Los ensayos son mantenidos bajo condiciones de invernadero y los tratamientos distribuidos en un diseño completamente al azar con dos niveles de suministro de agua: 80% de capacidad de campo (riego) y sin riego (simulación de sequía terminal) con 3 repeticiones. La capacidad de campo se determina luego de regar los cilindros —y permitir su drenaje— hasta el momento en el cual cada uno de estos alcance el 100% de dicha capacidad. Los tratamientos de suministro de agua se establecen después del crecimiento inicial de las plantas (10 días). Durante estos 10 días, la humedad del suelo inicial para los dos tratamientos es de 80% de capacidad de campo (CC). La humedad de las plantas bajo condiciones de riego (80% CC) se mantiene controlada por medio del pesaje de cada cilindro cada 2 días (p. ej., lunes, miércoles y viernes). Así, se aplica el agua necesaria —por

la parte superior del cilindro— para alcanzar de nuevo el 80% de CC (Figura 15). Las plantas bajo sequía terminal no seguirán recibiendo el riego; luego, se pesa cada cilindro cada 2 días con el fin de determinar la disminución de la humedad en el suelo a través del ensayo hasta la cosecha.

Las plantas son cosechadas a los 45 días después de siembra (35 días sin suministro de agua). La capacidad de campo es determinada al aplicar agua suficiente a 5 cilindros sin plantas y se deja drenar libremente hasta que cese (24-48 horas). Se determina mediante la diferencia con el suelo seco y se expresa en porcentaje (%).

Un número de características fisiológicas son medidas durante el periodo de crecimiento y desarrollo de la planta (Figura 15). Dentro de esos parámetros se incluyen:

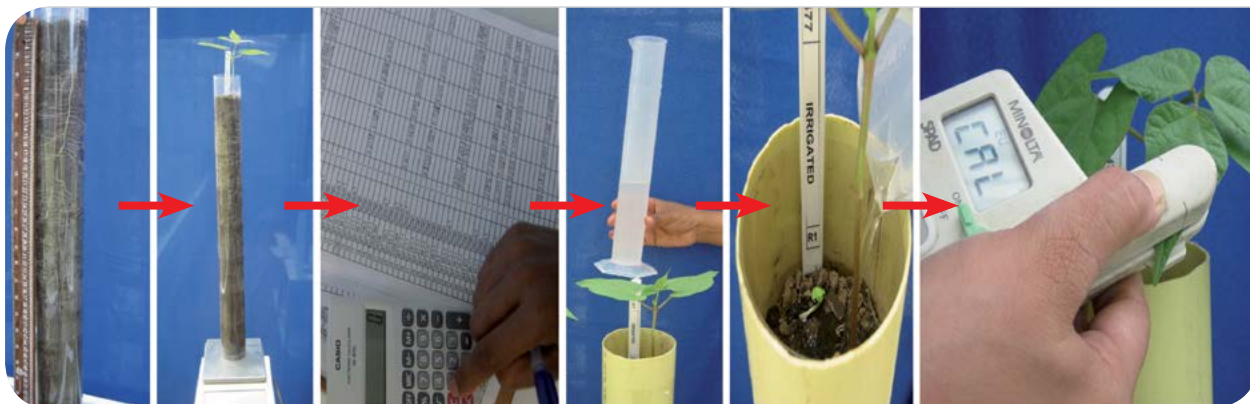


Figura 15. Mediciones de enraizamiento profundo, medida de contenido de clorofila de la hoja y mantenimiento del 80% capacidad de campo.

Profundización visual de la raíz

Esta se realiza simultánea al monitoreo de la humedad. Se puede establecer con ayuda de una regla y, de este modo, se registra la profundización alcanzada por las raíces visibles (esa es la ventaja del método del uso de cilindros plásticos transparentes).

Lectura del valor de clorofila (SPAD) en la hoja

Esta es estimada con un medidor de clorofila de mano no destructivo (SPAD-502 *Chlorophyll Meter*, Minolta Camera Co., Ltd., Japan). Los valores SPAD

son medidos en la hoja joven —expandida por completo— por cada repetición, cada semana hasta el momento de la cosecha.

Conductancia estomática

Se mide en la hoja joven con un porómetro SC1 Decagon cada semana hasta el momento de cosecha. El porómetro SC1 es proporcionado por Decagon Devices, Inc., USA.

Eficiencia fotosintética

La eficiencia del fotosistema II en hojas adaptadas a la luz (F_v'/F_m') se mide con un FLUORPEN FP100 en la hoja joven —expandida por completo— cada semana hasta el momento de cosecha. El *fluorpen* (fluorímetro de clorofila portátil) es distribuido por la compañía *Qubit Systems* en Canadá (www.qubitbiology.com/about-us/).

Posteriormente, en tiempo de cosecha (45 días después de siembra, 35 días sin aplicación de agua), se corta la planta al nivel de la superficie del suelo y luego se separa en hojas (sin pecíolo), tallo y remanente (vainas y estructuras reproductivas) (Figura 16). Si se cuenta con un medidor de área foliar (p. ej., LICOR modelo LI-3000, USA), se mide el área foliar. Luego, las partes de la plantas se ponen en bolsa de papel para realizar el secado en horno a 60 °C por 2 días. Después del secado de las muestras, se registra el peso seco. Con estos pesos secos, es posible conocer la distribución de la biomasa en las diferentes estructuras de la planta y su producción total en biomasa. El cilindro con suelo es cortado en 6 profundidades (0-5, 5-10, 10-20, 20-40, 40-60 y 60-75 cm). Posteriormente, las raíces son separadas del suelo mediante el lavado a mano, de este modo quedan limpias (sin materia orgánica) y se escanean (Figura 16).

Mediante un sistema de análisis de imágenes (WinRHIZO V. 2003b) se determina la longitud total de raíz y diámetro promedio. Luego de escanear las raíces, estas se ponen en bolsas de papel para secarlas al horno a 60 °C por 2 días; así, su peso seco de es cuantificado. Al terminar, con los datos de la longitud de la raíz (m/planta) y su peso (g/planta), se puede calcular la longitud específica de la raíz (m/g).

Con el fin de estimar la absorción de nutrientes en la parte aérea (N, P, K, Ca y Mg), el contenido de cenizas y de CTNE, las plantas secas son molidas, empacadas en tubos de vidrio y enviadas al laboratorio para su posterior análisis. La concentración de CTNE es determinada con el uso de NaOH como medio de extracción y antrona como reactivo. La absorbancia de la solución es medida con un espectrofotómetro a 620 nm y la concentración de CTNE es establecida mediante comparación con glucosa estándar [adaptado de Kand y Brink (1995)]. Ver protocolo CTNE en página 24.

Para finalizar, el análisis de varianza es calculado con el programa SAS (SAS/STAT, 2001) con un nivel de probabilidad del 0,05 (considerada estadísticamente significativa).



Figura 16. En época de cosecha, se corta la planta al nivel del suelo, se separa en hojas, tallos y estructuras reproductivas; se corta el cilindro en 6 profundidades; las raíces se lavan, limpian y escanean para el análisis de las imágenes.

Referencias

- Beebe SE; Rao IM; Cajiao C; Grajales M. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci* 48:582-592.
- Beebe SE; Rao IM; Blair MW; Acosta-Gallegos JA. 2010. Phenotyping common beans for adaptation to drought. En: Ribaut JM; Monneveux P. Eds. *Drought phenotyping in crops: From theory to practice*. Generation Challenge Program Special Issue on Phenotyping. pp. 311-334.
- Beebe SE; Rao IM; Blair MW; Acosta-Gallegos JA. 2013. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Front. Physiol.* 4:1-20.
- Butare L; Rao IM; Lepoivre P; Polanía J; Cajiao C; Cuasquer J; Beebe S. 2011. New genetic sources of resistance in the genus *Phaseolus* to individual and combined aluminium toxicity and progressive soil drying stresses. *Euphytica* 181(3):385-404.
- Farquha GD; Ehleringer JR; Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:503-537.
- Fischer KS; Lafitte R; Fukai S; Atlin G; Hardy B. Eds. 2003 *Breeding rice for drought-prone environments*. Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute (IRRI).

- Fisher RA; Maurer R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. *Aust. J. Agric. Res.* 29: 897-912.
- Gale MR; Grigal DF. 1987. Vertical root distribution of northern tree species in relation to successional status. *Can J. For. Res* 17:829-834.
- Kang JH; GE. Bringk. 1995. White clover morphology and physiology in response to defoliation interval. *Crop Sci.* 35:264-269.
- Muñoz-Perea CG; Terán H; Allen RG; Wright JL; Westermann DT; Singh SP. 2006. Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. *Crop Sci.* 46:2111-2120.
- Polanía J; Rao IM; Beebe S; Garcia R. 2009. Desarrollo y distribución de raíces bajo estrés por sequía en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en un sistema de tubos con suelo. *Agron Colombiana* 27:25-32.
- Polanía J; Rao I. M; Cajiao C; Rivera M; Raatz B; Beebe S. 2016A. Physiological traits associated with drought resistance in Andean and Mesoamerican genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*.
- Polanía J; Poschenrieder C; Beebe S; Rao IM. 2016B. Effective use of water and increased dry matter partitioned to grain contribute to yield of common bean improved for drought resistance. *Front. Plant Sci.* 7:660.
- Rao IM; Beebe S; Polanía J; Ricaurte J; Cajiao C; García R. 2013. Can tepary bean be a model for improvement of drought resistance in common bean? *African Crop Sci. J.* 21: 265-281.
- Terán H; Singh S. P. 2002. Selection for drought resistance in early generations of common bean populations. *Can. J. Plant Sci.* 82:491-497.
- Thung M; Rao I. M. 1999. Integrated management of abiotic stresses. En S.P. Singh (Ed.) *Common bean improvement in the twenty-first century*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 331-370.
- White JW; Izquierdo J. 1991. Physiology of yield potential and stress tolerance. En: van Schoonhoven A; Voysest O (Eds.). *Common beans: Research for crop improvement*. Cali, Colombia: CAB International, Wallingford, UK & CIAT. pp. 287-382.
- White JW; Singh SP. 1991a. Breeding for adaptation to drought. In van Schoonhoven A; Voysest O (Eds.). *Common beans: Research for crop improvement*. Cali, Colombia: CAB International, Wallingford, UK & CIAT. pp. 501-560.
- Wortmann CS; Kirkby RA; Eledu CA; Allen DJ. 1998. *Atlas of common bean (Phaseolus vulgaris L.) production in Africa*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

✉ CONTACTOS

José A. Polanía

j.a.polania@cgiar.org

Idupulapati M. Rao

i.rao@cgiar.org

Jaumer Ricaurte

j.ricaurte@cgiar.org

Mariela Rivera

m.rivera@cgiar.org

Fenotipaje de frijol para la fijación simbiótica de nitrógeno (SNF)



Protocolo para la evaluación en campo

Introducción

El frijol común *Phaseolus vulgaris* L. es una leguminosa de sumo interés para la seguridad alimentaria. Cada año en el mundo se producen cerca de 23.250.253 toneladas (FAOSTAT, 2013).

Además, dicha leguminosa es rica en hierro, proteínas, fibra y carbohidratos esenciales para la nutrición de la población, en especial en los países en desarrollo. Es producida por pequeños agricultores de escasos recursos en América Latina, Asia y África en ambientes marginales afectados por la sequía y la fertilidad escasa del suelo; en especial, nitrógeno y fósforo (Beebe et al., 2008).

Fijación simbiótica de nitrógeno (SNF)

La simbiosis entre las raíces de las leguminosas con los nódulos de *Rhizobium* spp., para captación de nitrógeno atmosférico, contribuye a mejorar la nutrición de este elemento en las plantas. Es una estrategia ecológica sana y de bajo costo para mejorar la productividad del cultivo de frijol común, frente al crecimiento poblacional y el cambio climático mundial. Sin embargo, debe considerarse que uno de los principales factores que determinan

la eficacia de la fijación simbiótica de nitrógeno (SNF, por sus siglas en inglés) es el genotipo de la planta.

Por lo tanto, la identificación de los rasgos clave de la planta y los mecanismos que contribuyen a la mejor SNF [p. ej., la evaluación visual de la nodulación de raíz, el isótopo nitrógeno¹⁵ (¹⁵N) en tejido y el grano, la biomasa de dosel, la fotosíntesis, la absorción de nitrógeno, el índice de particionamiento de vaina y el índice de cosecha de la vaina] pueden incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento, a través de la selección de genotipos superiores. El siguiente protocolo permite la identificación de las diferencias fenotípicas en SNF en condiciones de campo a través de la cuantificación de características relacionadas con la capacidad de la planta para fijar nitrógeno [% de nitrógeno derivado de la atmósfera basado en la abundancia de ¹⁵N natural en el tejido y el grano (%Ndf = nitrógeno derivado de la atmósfera) y la evaluación visual de nodulación de la raíz].

Diseño de campo

En primer lugar, es necesario realizar ensayos de campo durante la estación lluviosa (sin estrés, ni fertilización nitrogenada) e inocular con *Rhizobium tropici* CIAT 899. Los ensayos podrían incluir accesiones de germoplasma, líneas de mejoramiento y líneas recombinantes. Estas condiciones se deben aplicar para cuantificar los efectos de la SNF en los rendimientos de crecimiento y semilla.

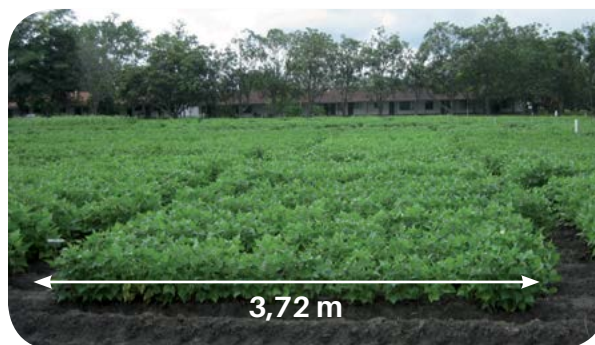
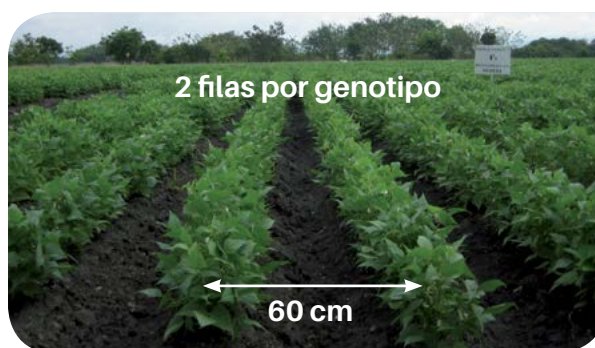
Según sea el número de genotipos a ser evaluado, podría usarse un diseño en *lattice* con 3 repeticiones. Las pruebas de campo pueden ser plantadas en filas continuas con cada genotipo, por repetición, en 2 filas a lado y lado (o 4 filas para ensayos pequeños) de 2 a 4 m de longitud. Las filas tendrán 60 cm de separación. Las semillas se deben plantar cada 7,5 cm (15 semillas por m). Esto corresponde a 10-15 plantas por metro.

Luego, se aplican las bolsas de turba estéril del inóculo de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) en una dosis de 3 kg/ha o 15 bolsas de inóculo por cada 50 litros de agua de grifo. Esto se realiza mediante una aspersión dirigida a la base de la raíz y el suelo de cada planta con una primera hoja trifoliada. El inóculo debe tener $2,2 \times 10^7$ UFC/g garantizado por una prueba de viabilidad en laboratorio.

Muestreo en el momento de la floración

Determinación de días y estado de "floración"

Se mide individualmente para cada parcela. Es el momento cuando el 50% de las plantas están floreciendo (p. ej., la mayoría de las plantas tiene flores totalmente desarrolladas).



Lecturas con el medidor de clorofila SPAD (SCMR)

Este equipo (El SPAD-502) determina la cantidad relativa de clorofila presente en una hoja mediante la medición de la absorción en esta en dos rangos de longitudes de onda. La clorofila tiene picos de absorción en las regiones azul (400-500 nm) y rojo (600-700 nm), sin transmitancia en la región cercana a la infrarroja. El SPAD-502 mide la absorbancia de la hoja en las regiones rojo y cercana a infrarrojo. Con esas 2 transmitancias, el medidor calcula un valor numérico SPAD en un rango de 0 a 80, el cual es proporcional a la cantidad de clorofila en la hoja. El valor de SPAD es medido sobre la hoja joven completamente expandida de una planta por cada repetición.



Rendimiento cuántico del fotosistema II (QY)

Para su medición, se utiliza un medidor de QY no destructivo de mano (p. ej, *Fluorpen* FP100). Este es un fluorómetro que permite la medición rápida y precisa de los parámetros de fluorescencia de la clorofila.

Las medidas FP100 FT (rendimiento de fluorescencia continua en luz no actínica) y QY (rendimiento de cuántico del fotosistema II) se establecen sobre una hoja joven, expandida por completo, de una planta para cada repetición. Se utiliza la misma hoja que en la medición SPAD.



Evaluación visual de nodulación de raíz

La escala visual de 1-9 se utiliza para evaluar el alcance de la nodulación.

Escala	Descripción	Número aproximado de nódulos	
		Frijol voluble	Frijol arbustivo
9	Excelente cantidad de nódulos	>240	>80
8	Muy abundante cantidad	240	80
7	Abundante	121-240	80-41
6	Intermedio-alto	121-240 (tamaño pequeño)	40-21 (tamaño pequeño)
5	Intermedio	61-120	40-21
4	Intermedio-bajo	61-120 (tamaño pequeño)	20-10 (tamaño pequeño)
3	Bajo	60-30	20-10
2	Muy bajo	<30	<10
1	Cero nodulación	0	0

Nota: Para evaluar la viabilidad de nódulo, el color dentro de este puede ser utilizado como una guía. Si es rosa o rojo el nódulo es viable y eficaz; si es verde o blanco el nódulo se considera inviable o ineficaz. Los números en la tabla pueden diferir entre diferentes experimentos. Por lo tanto, se recomienda tener una planta de referencia de clasificación 1 y otra de 8-9 para definir el número y el aspecto de los nódulos en ambos casos. Esto requiere algo de entrenamiento.



Clasificación 2 y 8 en la escala visual de la nodulación.

Evaluación visual del crecimiento de la planta

La evaluación se basa en una escala visual de 1-9 para el vigor de la planta (adaptación).

Escala	Frijol voluble / arbustivo
#	Descripción
9	Excelente
7-8	Buena
5-6	Intermedia
3-4	Deficiente
1-2	Muy deficiente



Nota. La evaluación debe basarse en una planta de control o referencia con la puntuación de 1. Esto requiere entrenamiento.

Preparación de las muestras para el análisis de $\delta^{15}\text{N}$ y el porcentaje de N [Universidad de California en Davis (UC Davis)]

Para determinar el $\delta^{15}\text{N}$ y el porcentaje de N presente, se selecciona una planta de cada genotipo, parcela o tratamiento para el muestreo destructivo. Esta se corta a nivel del suelo, se pone en una bolsa de papel y se transporta al laboratorio.

Allí, la planta es lavada con agua desionizada y secada en la estufa a 60 °C durante 2 días. Si se desea realizar un análisis —según, cada parte de la planta— esta se puede dividir en hojas, tallos y otras partes antes del secado.



Después de su paso por el horno de secado, las plantas se pasan al molino (las muestras deben quedar finas y homogéneas). Luego se envasan en tubos de vidrio; cada *Vacutainer* (tubo con un tapón plástico blando para cerrar herméticamente) contiene 10 g de tejido de planta.



A continuación, se pesan 3,0 mg de tejido de la planta en una microbalanza y las muestras se envasan en cápsulas de estaño para muestras sólidas (5 x 9 mm) (*Fisher Scientific*). Este proceso requiere de mucha destreza y precisión.

Cada cápsula se empaqueta herméticamente y en forma circular. Una a una se coloca en cada pozo de una placa de 96 pozos de cultivo de tejidos (total 96 pozos por placa) con fondo plano y con tapa [Ref. 353072, caja por 50 unidades (*FALCON*)]. Se considera el orden de secuencia: 1 a 12 corresponde a las columnas y de la A a la H a las filas. Para mayor información, se puede consultar el siguiente portal de internet: <http://stableisotopefacility.ucdavis.edu/13cand15npricing.html>



Cada caja es identificada para su envío a la UC Davis (California, Estados Unidos). La concentración de nitrógeno 15 ($\delta^{15}\text{N}$) y total (%) se determina con un analizador elemental PDZ Europa ANCA-GSL interconectado a un PDZ Europa [espectrómetro de masas de relación isotópica 20-20 (Sercon Ltd., Cheshire, Reino Unido)].



Foto: UC Davis, 2014

Muestreo a mitad de llenado de vaina

Determinación de “mitad de llenado de vaina”

La “mitad de llenado de vaina” se produce justo antes de que las hojas comiencen a amarillearse; entonces, la planta no tiene más flores y las semillas están claramente definidas en las vainas.



Lecturas de medidor de clorofila SPAD (SCMR) y rendimiento cuántico del fotosistema II (QY)

Para estas variables, el proceso es el mismo como para la floración (ver página 121).



Biomasa de parte aérea

Debe seleccionarse 0,5 metros de un surco por parcela para cada muestreo destructivo. Se cuentan las plantas y se cortan a ras del suelo. Luego, se colocan en una bolsa de plástico y se trasladan para su procesamiento.

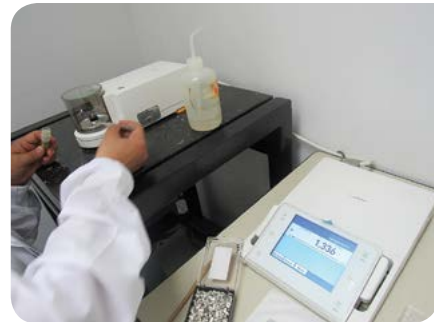


Cada muestra se coloca en bolsas de papel y luego en el horno de secado a 60 °C durante 2 días. La producción total de la materia seca y su distribución en partes diferentes de la planta (biomasa en hoja, tallo, vaina y total biomasa sobre el suelo) se cuantifican en una balanza.



Preparación muestras para análisis $\delta^{15}\text{N}$ y % N (UC Davis, California)

Para estas variables, el proceso es el mismo que para la floración (página 121).



Muestreo en época de cosecha

Determinación del “tiempo de cosecha”

El tiempo de cosecha ocurre cuando las hojas se tornan amarillas; entonces, la planta no tiene más flores y las semillas están claramente definidas en las vainas. Estas últimas se secan y las semillas suenan cuando estas se agitan.



Biomasa (vainas y granos)

Para su estimación, se selecciona 0,5 m de longitud de un surco para cada genotipo. Se toma el número de plantas y se cortan a ras del suelo. Las muestras se colocan en una bolsa de papel y son trasladadas para su análisis.



Las plantas se separan en tallos, vainas y semillas. Se cuenta el número de vainas y semillas por superficie cosechada. Los tallos, las vainas y las semillas se secan en el horno a 60 °C durante 2 días y se registran los pesos secos.



Preparación de muestras de $\delta^{15}\text{N}$ y el % N total en el grano (UC Davis, California)

Primero, se pesa el grano (8-14 g aprox.), se lava con agua del grifo y con agua bidestilada o desionizada. Cada muestra se coloca en una bolsa de papel y se lleva al horno de secado a 60 °C durante 2 días.



A continuación, las muestras de grano se muelen durante 4 minutos en cápsulas con pequeños balines dentro de cada muestra (molino de balines).



Las muestras una vez bien rotuladas y homogéneamente pulverizadas, se trasvasan a tubos de vidrio para su análisis de laboratorio. Cada *vacutainer* (tubo) debe contener 10 g de harina.



Luego, se pesan 3,0 mg de tejido de la planta en una microbalanza. Después, las muestras se envasan en cápsulas de estaño para muestras sólidas (5 x 9 mm) (*Fisher Scientific*). Este proceso requiere de mucha destreza y precisión.

Posteriormente, las muestras se colocan en platos o placas de cultivo de tejidos de 96 pozos. Finalmente, se envían con la identificación adecuada a UC Davis (California).



Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno

Escala visual de nodulación/genotipo (1-9)

En la evaluación visual según la escala de nodulación/genotipo, 1 corresponde a poca nodulación y 9 a la calificación máxima. En esta escala, se considera el tamaño de los nódulos; donde los más grandes tienen mejores calificaciones que los de tamaños medianos y pequeños.

Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (% Ndfa)

Para realizar el cálculo del porcentaje del nitrógeno derivado de la atmósfera (% Ndfa), se reemplaza en la fórmula, a continuación descrita, el dato obtenido y suministrado por la UC Davis.

$$\% \text{ Ndfa} = \frac{\delta^{15}\text{N de la planta patrón} - \delta^{15}\text{N de N}_2 \text{ leguminosa fijadora}}{\delta^{15}\text{N de la planta patrón} - B} \times \frac{100}{1}$$

Donde:

$\delta^{15}\text{N}$ de la planta patrón se refiere al individuo control (que no fija N_2 ‰)

$\delta^{15}\text{N}$ de la leguminosa fijadora de N_2 se refiere a los genotipos de frijol ‰ que fijan el N_2

B es el $\delta^{15}\text{N}$ de la parte aérea de las leguminosas que es altamente dependiente de la fijación de N_2 y que crece en un medio libre de N. Estas partes son seleccionadas en la misma etapa de crecimiento que las muestras del campo.

Contenido de nitrógeno en la parte aérea

El $\delta^{15}\text{N}$ y el porcentaje del nitrógeno de la parte aérea de la planta o del grano (3,0 mg de muestra) se pueden estimar a partir del análisis isotópico por espectrofotometría de masas. Los valores resultantes del % de N en la parte aérea del tejido se usan junto con la biomasa de esta para cuantificar el contenido de nitrógeno en kg/ha.

Uso eficiente del nitrógeno (NUE)

El uso eficiente del nitrógeno (NUE, por sus siglas en inglés) se obtiene a partir de la siguiente relación: kg de grano producido x kg del N tomado en la biomasa de la parte aérea = producción de grano en kg/ha/nitrógeno tomado en la parte aérea en kg/ha en biomasa.

Índice de partición de nitrógeno (%) (NPI)

El índice de partición de nitrógeno (NPI, por sus siglas en inglés) se obtiene a partir de la siguiente relación: kg de N en grano por ha/kg de N por ha en la biomasa de la parte aérea x 100.

Índice de cosecha (%) por genotipo (PHI)

El PHI se calcula así:

$\text{PHI} = (\text{peso seco de biomasa de semilla en cosecha}) / (\text{peso seco de biomasa de vaina en cosecha}) \times 100$.

Índice de partición de vainas (%) por genotipo

Es igual al siguiente cociente: (peso seco de biomasa de las vainas en cosecha) / (peso seco total de biomasa parte aérea a mitad de llenado de vaina) x 100.

Índice de cosecha (%) por genotipo (HI)

Es igual al siguiente cociente: (Peso seco de biomasa de las semillas en cosecha) / (peso seco total de biomasa parte aérea a mitad de llenado de vaina) x 100.

Eficiencia de la producción por genotipo

Es igual a: (peso seco de biomasa de las semilla en cosecha) / (peso seco total de biomasa parte aérea a mitad de llenado de vaina).

Eficiencia de producción de semilla por genotipo

Es igual a: (número de semillas por área) / (peso seco total de biomasa parte aérea a mitad de llenado de vaina por área). El valor se da en g^{-1} .

Eficiencia de producción de vainas por genotipo

Es igual a: (número de vainas por área) / (peso seco total de biomasa parte aérea a mitad de llenado de vaina por área). El valor se da en g^{-1} .

Peso de 100 semillas

Es el peso reportado en gramos de 100 semillas.

Análisis estadístico

Para todas las cuantificaciones anteriores, la varianza se calcula mediante el programa estadístico SAS/STAT, donde un nivel de probabilidad de 0,05 se considera estadísticamente significativo.

Referencias

- Beebe SE; Rao IM; Cajiao C; Grajales M. 2008. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci.* 48:582-592.
- Beebe SE; Rao IM; Blair MW; Acosta-Gallegos JA. 2010. Phenotyping common beans for adaptation to drought. En: Ribaut JM; Monneveux P. Eds. Drought phenotyping in crops: from theory to practice. Generation Challenge Program Special Issue on Phenotyping. pp. 311-334.
- CIAT-UNDP. 1988. Manual of Rhizobium legume symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management. Cali, Colombia: CIAT-UNDP.
- Douxchamps S; Humbert F; Hoek R; Mena M; Bernasconi SM; Schmidt A; Rao IM; Frossard E; Oberson A. 2010. Nitrogen balances in farmers fields under alternative uses of a cover crop legume: a case study from Nicaragua. *Nutr Cycl Agroecosyst* 88:447-462.
- FAOSTAT. 2013. <http://faostat.fao.org/> - Frijol común.
- Graham PH; Rosas JC. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with Rhizobium. *J Agric Sci* 88:503-508.
- Polanía J; Rivera M; Ricaurte J; Rao IM. 2012. Phenotyping common beans for adaptation to drought: protocol for field evaluation. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.
- Ramaekers L; Galeano CH; Garzon N; Vanderleyden J; Blair MW. 2012. Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation capacity and related traits in common bean. *Mol Breeding* 31:163-180
- Schoonhoven A; Corrales M. 1991. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT
- Unkovich M; Herridge D; Peoples M; Cadisch G; Boddey B; Giller K; Alves B; Chalk P. 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Australia: ACIAR Research that works for developing countries and Australia.

CONTACTOS

Norma Barbosa
n.c.barbosa@cgiar.org

José A. Polanía
j.a.polania@cgiar.org

Mariela Rivera
m.rivera@cgiar.org

Jaumer Ricaurte
j.ricaurte@cgiar.org

Idupulapati M. Rao
i.rao@cgiar.org



Capítulo 5

Protocolos adaptados para mediciones en material vegetal (Forrajes y Fríjol)

Metodología para evaluar genotipos del género *Brachiaria* en soluciones nutritivas con alto aluminio

Introducción

Los suelos ácidos cubren alrededor del 85% de la región central de Suramérica tropical y corresponden a los siguientes órdenes: 40% Oxisoles, 26% Ultisoles, 1,5% Spodosoles, <1% Histosoles, 13% de grandes grupos ácidos de Entisoles y 4,5% de grandes grupos ácidos de Inceptisoles. En esta región, 358,6 millones de hectáreas (Mha) tienen niveles tóxicos de aluminio (Al) con más del 70% de saturación (Cochrane, 1991). Los suelos ácidos del trópico, altamente intemperizados, se caracterizan por una combinación de deficiencias nutricionales y toxicidad de minerales. La fitotoxicidad por Al es la principal limitación para la producción agrícola en este suelo (Rao et al., 1993). No obstante, especies del género *Brachiaria* (gramíneas forrajeras tropicales) son y han sido ampliamente

sembradas en el mundo (Miles et al., 2004). Para el 2008, en Brasil estaban sembrados 99 Mha con *Brachiaria* spp., de las cuales 50 Mha eran del cultivar *B. brizantha* cv. Marandu (Jank et al., 2014). Un programa de mejoramiento en el CIAT ha buscado combinar la adaptación a suelos ácidos de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk con la resistencia de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú al salivazo o miomión de los pastos (Miles et al., 2004). En el CIAT, se ha desarrollado una metodología confiable, rápida y sencilla para la evaluación de genotipos de *Brachiaria* con mejor resistencia a Al (Wenzl et al., 1999, 2003, 2006) que ha permitido la identificación de genotipos de *Brachiaria* con resistencia al Al en solución (Rao et al., 2001, 2003, 2008).

Principio

La respuesta inicial de las plantas frente a las altas concentraciones de Al está relacionada con la inhibición de la división celular en los meristemas apicales (Marschner, 1995), la inhibición de la elongación (Rangel et al., 2007) y el engrosamiento del sistema de raíces (Klotz and Horst, 1988; Rao et al., 2001; Wenzl et al., 2006). El grado de la inhibición en el crecimiento de las raíces es un indicador de las diferencias genotípicas en toxicidad por Al. La fitotoxicidad por el Al en las raíces está no solo relacionada con su concentración sino, en particular, con las especies de Al en el suelo y la concentración de los componentes orgánicos e inorgánicos que forma complejos con el Aluminio (Al) (Marschner, 1995).

Una evaluación realista sobre la adaptación de las plantas a suelos ácidos tropicales con alto Al requiere simultáneamente niveles tóxicos de Al y deficiencia de nutrientes como factor limitante. Por ejemplo, la concentración de nutrientes en solución de un Oxisol de sabana de los Llanos Orientales de Colombia tuvo una fuerza iónica inferior a 1,7 mM (Wenzl et al., 2003). Este y otros factores como el pH, los tiempos de cambio de la solución, de crecimiento y enraizamiento de plántulas – a partir de estolones sembrados en solución nutritiva – como el tiempo de exposición de las plántulas enraizadas a tratamientos, con y sin Al, fueron considerados en el diseño de esta metodología para evaluar e identificar genotipos de *Brachiaria* con resistencia a niveles altos de Al en solución (Wenzl et al., 2003, 2006).

Metodología

Esta metodología, desarrollada por Wenzl et al. (2001, 2003, 2006), comprende dos etapas: en la primera, se obtienen plántulas enraizadas y, en la segunda, se evalúan las plántulas enraizadas en solución sin y con Al alto (Figura 1).

Obtención de plántulas enraizadas

Multiplicación de material en suelo

Las plantas son multiplicadas en un suelo ácido con baja fertilidad. En el caso del CIAT, en Palmira-Colombia, se ha usado uno del municipio de Santander de Quilichao [pH 4,6 suelo:agua 1:1, P 14,7 mg kg⁻¹ extraído con Bray II, Al 1,8 cmol_c kg⁻¹ extraído con KCl, K 0,15 cmol_c kg⁻¹ extraído con Bray-II, Ca 2,3 cmol_c kg⁻¹ extraído con KCl, y Mg 1,3 cmol_c kg⁻¹ extraído con KCl, (Wenzl et al., 2006)] (Figura 1).

El suelo es colectado de los primeros 20 cm de profundidad y, para permitir un mejor drenaje, es mezclado con arena en la proporción 3 suelo: 1 arena. Con el fin de asegurar buen desarrollo de las plantas, se requiere un suministro de nutrientes (en mg del elemento por kg⁻¹ de la mezcla de suelo-arena), que en este suelo puede ser: 21 de N, 26 de P, 52 de K, 34 de Ca, 15 de Mg, 10 de S, 1 de Zn, 1 de Cu, 0,5 de B y 0,05 de Mo. Luego, se llenan potes de 8 pulgadas con 4 kg de la mezcla de suelo-arena humedecidos con agua corriente y se siembran con 3 a 5 plantas por pote. En condiciones del CIAT-Palmira, la primera cosecha de estolones se ha realizado entre los 45 y 50 días después de la siembra, tiempo durante el cual el suelo debe estar con una humedad cercana a la capacidad de campo.

Después de la primera cosecha de estolones, las plantas deben ser cortadas a una altura aproximada 5 cm sobre la superficie del suelo, dependiendo de la longitud de entrenudos, se fertiliza con la mitad de la dosis de N. En condiciones del CIAT-Palmira, una segunda cosecha de estolones se ha obtenido a los 30 días y, una tercera, 30 días después. Estos tiempos pueden variar con las condiciones del sustrato y del ambiente de crecimiento. Al terminar la tercera cosecha, el suelo debe ser removido y, en lo posible, desinfectado con vapor de agua durante unas 4 horas antes de volver a sembrar en él. Estas labores contribuyen a oxigenar el suelo (en estado de compactación, copado de raíces y con un rebrote débil de plantas) y a minimizar problemas de patógenos.



Figura 1. Método de selección para resistencia a Al en solución en genotipos de *Brachiaria*. Propagación vegetativa en suelo: arena 3:1 (20-45 días) y cosecha de estolones; transferencia de estolones seleccionados a solución completa de baja fuerza iónica para enraizamiento (9 días); prueba en solución sin y con Al (21 días); separación de raíces y escaneo para obtener imágenes que luego son analizadas con el programa WinRHIZO para cuantificar la longitud y el diámetro promedio.

Corte y selección de estolones para enraizar

En general, los estolones de aspecto joven con 3 a 5 hojas (1 a 3 nudos) forman un mejor tipo de plántula enraizada en la solución. Estolones muy jóvenes tienen el riesgo de generar plántulas de baja calidad y los viejos suelen no formar un buen sistema de raíces (Figura 2).



Figura 2. Selección de estolones de *Brachiaria* para enraizar en solución nutritiva. Plantas listas para cosecha de estolones (izquierda), potencialmente apropiados o no para formar buenas plántulas (medio y derecha).

Enraizamiento en solución nutritiva

Solución de enraizamiento

Esta solución de baja fuerza iónica (Tabla 1) soporta cerca del máximo crecimiento de plántulas de *Brachiaria* (Wenzl et al., 2003). Debe ser preparada con agua desionizada y estar lista antes del trasplante de los estolones limpios a la solución. Con el fin de facilitar su preparación, una solución que llamaremos “stock” (Tabla 2), y otra que llamaremos de trabajo, puede hacerse a partir de los reactivos adquiridos, almacenados y manejados apropiadamente en laboratorio.

Tabla 1. Composición final de la solución nutritiva para enraizamiento de estolones de *Brachiaria*

Compuesto	Concentración final (μM)
NH_4NO_3	500
KNO_3	300
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	200
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	90
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ *	5
$\text{Na-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ *	5
H_3BO_3	6
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{HO}$	1
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	5
NaCl	55
HCl **	0,0000675 N

** El ajuste de pH a 4,2 en la solución final se puede hacer a partir de 3,375 ml de HCl 1 N de la solución “stock”.

Tabla 2. Solución “stock” para la preparación de la solución nutritiva final en la etapa de enraizamiento de estolones de *Brachiaria*

Compuesto	Concentración (M)	Peso del compuesto (g l^{-1})	Volumen de la solución (ml l^{-1})
NH_4NO_3	0,5	40,02	50
KNO_3	0,3	30,333	50
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2	47,24	50
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05	6,9	5
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,18	37,083	25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,12	28,986	25
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ *	0,01	2,703	25
Na-EDTA *	0,01	3,722	25
H_3BO_3	0,12	7,42	2,5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02	3,38	2,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	5,751	2,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,004	0,999	2,5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{HO}$	0,5	0,121	0,1
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,01	2,842	25
NaCl	0,55	32,14	5
HCl **	1 N		3,375

* El $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y el Na-EDTA se preparan juntos

** El ajuste de pH a 4,2 en la solución final se realiza a partir de 3,375 ml de HCl 1 N en la solución “stock”. Se usa un electrodo de pH diseñado para soluciones de baja fuerza iónica.

Para preparar la solución de trabajo, se pesan 1,937 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se disuelven en 500 ml de agua desionizada; se adicionan las cantidades (ml) de cada uno de los compuestos indicados en la columna “volumen de la solución stock” de la Tabla 2 y se completa con agua desionizada hasta un volumen de 1 litro. Para preparar la solución final, donde son trasplantados los estolones a enraizar, se ajusta el pH a 4,2 con HCl 1 N y se toman 20 ml de la solución de trabajo por cada litro de solución a preparar.

Enraizamiento de plántulas

El enraizamiento para obtener plántulas es realizado en bandejas en fibra de vidrio con capacidad para 200 litros de solución. Estas son aisladas de la solución con bolsas de polietileno negro que se reemplazan con el cambio de solución al quinto día de sembrados los estolones (Figura 1).

Evaluación de plántulas enraizadas con Al en solución

Soluciones control y de prueba

Una primera solución con $200 \mu\text{M}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es usada como testigo (sin Al). Esta permite evaluar el vigor del sistema de raíces y refleja la habilidad de las plantas para producir un sistema de raíces extenso que explore un volumen de suelo para la absorción de nutrientes (Wenzl et al., 2006), agua y recursos del suelo.

Una segunda solución con $200 \mu\text{M}$ de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + $200 \mu\text{M}$ CaCl_2 permite comparar el crecimiento del sistema de raíces con la solución testigo. Esto brinda una medida de la resistencia a Al (Wenzl et al., 2006). Luego, el pH de las dos soluciones es ajustado a 4,2; de este modo, con la baja concentración de Ca^{2+} en las soluciones, se protege las membranas plasmáticas de las raíces (Wenzl et al., 2006). Para facilitar la preparación de las soluciones, se hacen dos “stock” 0,01 M: para el primero, se pesan 1,4702 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (por cada litro) y, para el segundo, 2,415 g de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (por cada litro). En la preparación de la solución de prueba sin Al, por cada litro, se toman 20 ml de la solución “stock” de CaCl_2 . Para la solución con Al, se toman 20 ml de la solución “stock” de CaCl_2 + 20 ml del “stock” de AlCl_3 por cada litro (Tabla 3). Las soluciones se ajustan a pH 4,2 con HCl 1 N, se cambian cada 48 horas y, al igual que la solución de enraizamiento, son aireadas permanentemente.

Tabla 3. Solución prueba para la evaluación de la resistencia de genotipos de *Brachiaria* a contenidos altos de aluminio en solución.

Sal	Concentración (μM)
Solución control (0 Al)	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200
Solución prueba (200 μM Al)	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200
HCl*	0,0000675 N

* Usado en el ajuste de pH a 4,2

Evaluación de plántulas enraizadas

Las plántulas enraizadas se pasan a bandejas plásticas (42 cm de largo, 28 cm de ancho y 22 cm de alto) forradas en bolsas negras de polietileno que contienen 16 l de la solución. Se siembra un panel de 40 cavidades por bandeja y una plántula enraizada por cavidad. Se forman parejas similares de plántulas: una para siembra en la bandeja sin Al y la otra para la bandeja con Al (Figuras 1 y 3). La similitud de las plántulas en tamaño de estolón, número y tamaño de hojas, número y tamaño de nudos, así como en número y tamaño de raíces son criterios usados para hacer la selección de parejas a colocar e identificar con y sin Al (Figura 1). Lo que se pretende con la conformación de estas parejas es contribuir a disminuir el error experimental. El período de evaluación, sin y con Al, es de 21 días.



Figura 3. Detalle de panel con cavidades tubulares usadas en el enraizamiento-evaluación de estolones (foto izquierda) de genotipos de *Brachiaria* en soluciones luego de 21 días sin y con 200 μM de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ambas fotos). A la izquierda de cada foto, puede apreciarse el tratamiento sin Al y a la derecha con 200 μM Al.

Terminados los 21 días de evaluación, se cosechan los estolones, se separan las raíces de la parte aérea (Figuras 1 y 3) para obtener los valores de longitud y diámetro promedio del sistema de raíces. Para ello, es necesario tener un sistema que cuantifique esos valores de forma precisa, exacta y ágil.

La precisión se refiere a la dispersión de los datos obtenidos en las repeticiones de un análisis y la exactitud al mayor o menor ajuste que tengan los resultados con respecto al valor real del sistema o medio que se mide (Salinas y García, 1985). En el CIAT Palmira, para obtener las imágenes de las raíces, se eligieron equipos “Epson” (Epson *Expression* 1680, 10 000XL, 11 000XL) compatibles con el programa de computador “WinRHIZO” (versiones 2003b, pro 2007d) de “Regent Instruments” para el análisis de esas imágenes [Regent Instruments (2003, 2007)].

Los escáneres seleccionados permiten obtener una imagen de alta calidad sin necesidad de realizar una tinción de las raíces y, al ser compatibles con el programa “WinRHIZO”, agilizan la evaluación de los genotipos de *Brachiaria* sin y con Al en solución. Una buena imagen en el escáner Epson *Expression* 1680, arriba mencionado, se puede lograr con las opciones: “mode: professional; document type: transparency; film type: positive film; image type: 16 bit grayscale; resolution: 200 a 300 dpi; target size: original; Scale: 100%”.

Las imágenes de las raíces pueden ser analizadas con el programa “WinRHIZO” que mide variables morfológicas de la raíz (Tabla 4).

Los resultados pueden ser presentados en tablas y/o gráficos donde se muestran los genotipos con los valores de longitud y diámetro promedio. Este tipo de información permite comparar el vigor del sistema de raíces sin Al y los efectos del aluminio sobre la longitud y engrosamiento de las raíces (Rao et al., 2001, 2003, 2008).

Tabla 4. Variables morfológicas medidas en varias versiones del programa “WinRHIZO” en imágenes escaneadas de raíces*

Medida de la morfología de la raíz	Versión “WinRHIZO”			
	“Basic”	“Reg”	“Pro”	“Arabid”
Global (para la imagen completa)				
Longitud total	Sí	Sí	Sí	Sí
Diámetro promedio	Sí	Sí	Sí	Sí
Área total	Sí	Sí	Sí	Sí
Número de puntas, ramificaciones y cruces	Sí	Sí	Sí	Sí
Conteo manual de nódulos (no automático)	Sí	Sí	Sí	Sí
En función del diámetro de raíz (clasificado por diámetro)				
Longitud		Sí	Sí	Sí
Área, volumen		Sí	Sí	Sí
Número de puntas		Sí	Sí	Sí
En función del color de la raíz				
Longitud			Sí	Sí
Área, volumen			Sí	Sí
Número de puntas			Sí	Sí
Arquitectura de raíz con dimensiones fractales				
Arquitectura con dimensiones fractales			Sí	Sí
Análisis de colores				
Análisis de colores			Sí	Sí

*Fuente: www.regentstruments.com/assets/winrhizo_software.html

Nota:

Autores de esta sección: Jaumer Ricaurte, Ramiro García, Jarden Molina, Martín Otero e Idupulapati M. Rao.

Referencias

- Cochrane TT. 1991. Understanding and managing acid soils of Tropical South America. En: Deturk P; Ponnampereuma FN. Eds. Rice production on acid soils of the tropics. Sri Lanka: Institute of Fundamental Studies. pp. 113-122.
- Jank L; Barrios SC; do Valle CB; Simeão RM; Alves G. 2014. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop and Pasture Science* 65(11):1132-1137.
- Klotz F; Horst WJ. 1988. Genotypic differences in aluminium tolerance of soybean (*Glycine max* L.) as affected by ammonium and nitrate-nitrogen nutrition. *J. Plant Physiol.* 132(6):702-707.
- Marschner H. 1995. Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions. En: Marschner H (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd ed. Academic Press Inc. pp. 596-680.
- Miles JW; do Valle CB; Rao IM; Euclides VPB. 2004. *Brachiaria* grasses. En: Moser L; Burson B; Sollenberger LE. Eds. Warm-season (C₄) grasses. Madison, WI, USA: ASA-CSSA-SSSA. pp. 745-783.
- Rangel AF; Rao IM; Horst WJ. 2007. Spatial aluminium sensitivity of root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with contrasting aluminium resistance. *J. Exp. Bot.* 58(14):3895-3904.
- Rao IM; Zeigler RS; Vera R; Sarkarung S. 1993. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *Bioscience* 43(7):454-465.
- Rao IM; Miles JW; Wenzl P; García R; Ricaurte J. 2001. Identification of Al-resistant *Brachiaria* hybrids. In: Annual Report 2001 Project IP-5 Tropical Grasses and Legumes: Optimizing genetic diversity for multipurpose use. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp. 110-112.
- Rao IM; Miles JW; García R; Ricaurte J. 2006. Selección de híbridos de *Brachiaria* con resistencia a aluminio. *Pasturas Tropicales* 28(1):20-25.
- Rao IM; Wenzl P; Arango A; Miles J; Watanabe T; Shinano T; Osaki M; Wagatsuma T; Manrique G; Beebe S; Tohme J; Ishitani M; Rangel A; Horst W. 2008. Advances in developing screening methods and improving aluminum resistance in common bean and *Brachiaria*. *Braz. J. Agric. Res* 14(4):1-7.
- Regent Instruments Inc. 2003. WinRHIZO 2003 b basic, reg & pro for washed root measurements: 94. Disponible en http://regent.qc.ca/assets/winrhizo_software.htm.
- Regent Instruments Inc. 2007. WinRHIZO basic, reg & pro 2007 a,b,c, d for washed root measurements. Quebec, Canada: Regent Instruments Inc.
- Salinas JG; García R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Wenzl P; Patiño GM; Chaves AL; Rao IM. 1999. Studies on mechanisms of acid soil adaptation in *Brachiaria* cultivars and development of a screening method. In: Annual report 1999 Project IP-5, tropical grasses and legumes: optimizing genetic diversity for multipurpose use. (pp. 92-101). Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Wenzl P; Patiño GM; Chaves AL; Mayer JE; Rao IM. 2001. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiol.* 125:1473-1484.
- Wenzl P; Mancilla LI; Mayer JE; Albert R; Rao IM. 2003. Simulating infertile acid soils with nutrient solutions: the effects on *Brachiaria* species. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67:1457-1469.
- Wenzl PA; Arango AL; Chaves ME; Buitrago GM; Patiño GM; Miles J; Rao IM. 2006. A greenhouse method to screen *Brachiaria* grass genotypes for aluminum resistance and root vigor. *Crop Sci.* 46:968-976.

✉ CONTACTOS
Jaumer Ricaurte
j.ricaurte@cgiar.org
Idupulapati M. Rao
i.rao@cgiar.org

Diferencias fenotípicas en desarrollo de pelos de raíces entre genotipos de frijol común

Introducción

Cerca del 60% de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en América Latina es producido en suelos con fósforo (P) deficiente (Rao et al., 1997). Este elemento es parcialmente soluble, no es muy móvil y las plantas solo pueden usar una pequeña fracción del P total del suelo (Batjes, 2011). Identificar atributos de la planta que puedan estar relacionados

con adaptación a bajo P es muy importante en la mejora de productividad de frijol común en ambientes tropicales. Los pelos de las raíces mejoran la adquisición de nutrientes inmóviles de alta demanda por la planta, como el P (Jungk, 2001), y su presencia es variable entre genotipos de frijol (Yan et al., 2004; Vieira et al., 2007).

Metodología

La metodología descrita a continuación se basa en el método descrito por Vieira et al. (2007) modificado en algunas de sus partes. Su uso es recomendable en condiciones de invernadero, donde un grupo de 10 semillas de buena calidad, por genotipo, se deben seleccionar, pesar y embeber en agua corriente durante una hora antes de la siembra.

La siembra es realizada en un sistema de emparedado (soporte en acrílico – espuma, papel de germinación, semillas, papel de germinación, espuma – x 3 – soporte en acrílico) sumergido en una lámina de agua corriente y limpia de 4 cm de profundidad.

En condiciones de invernadero en el CIAT Palmira, al cabo de cinco días se seleccionan tres plántulas para evaluar el número de verticilos de las raíces basales (NVRB), el número de raíces basales (NRB), la longitud de la raíz principal (mm) y la longitud de una raíz basal seleccionada del segundo verticilo (mm).

En el evento que la plántula seleccionada solo tenga un verticilo de raíz, se escoge una raíz basal de este único verticilo.

Luego, se selecciona una sección de la raíz principal y una de basal seleccionada del segundo verticilo (2,0–2,5 cm de la base) para obtener imágenes escaneadas de los pelos de las raíces.

De no hacerse el escaneo de las raíces en forma inmediata, estas se pueden conservar en una solución al 10% v/v de metanol del 96%/l de solución en agua desionizada.

En el CIAT-Palmira, se obtienen las imágenes con un escaner “EPSON *Expression* 10 000 XL” opción 6200 dpi. Después, estas son analizadas con el programa “WinRHIZO 2007d” para medir la longitud de los pelos de las raíces (mm^{-1}) en 3 sitios de cada sección de la raíz (Figura 1).

Una evaluación visual de la densidad de los pelos se realiza, simultáneamente, en esos 3 sitios seleccionados con una escala visual. 1, 2, 3 es baja, 4, 5, 6 es media y 7, 8, 9 es alta densidad.

Evaluación de las diferencias en las características de la raíz

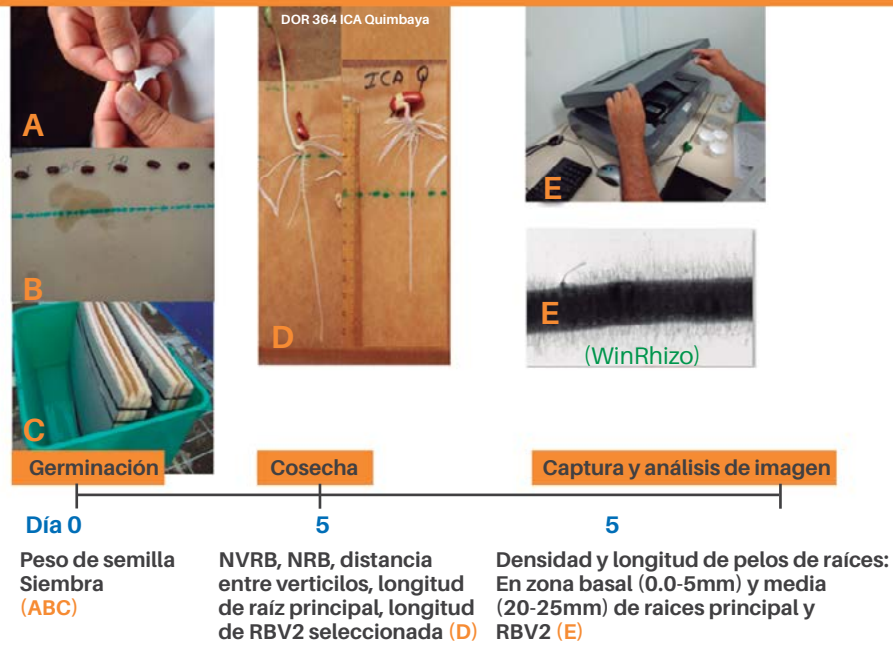


Figura 1. Metodología usada para la identificación de genotipos de frijol común con mayor densidad y longitud de pelos de raíces bajo condiciones de invernadero en el CIAT-Palmira. Siembra de 10 semillas por genotipo en un sistema de emparedado (A, B, C) sumergido en una lámina de agua corriente y limpia de 4 cm de profundidad; evaluación de corona de raíz, densidad y longitud de pelos de raíces 5 días después de la siembra (D, E).

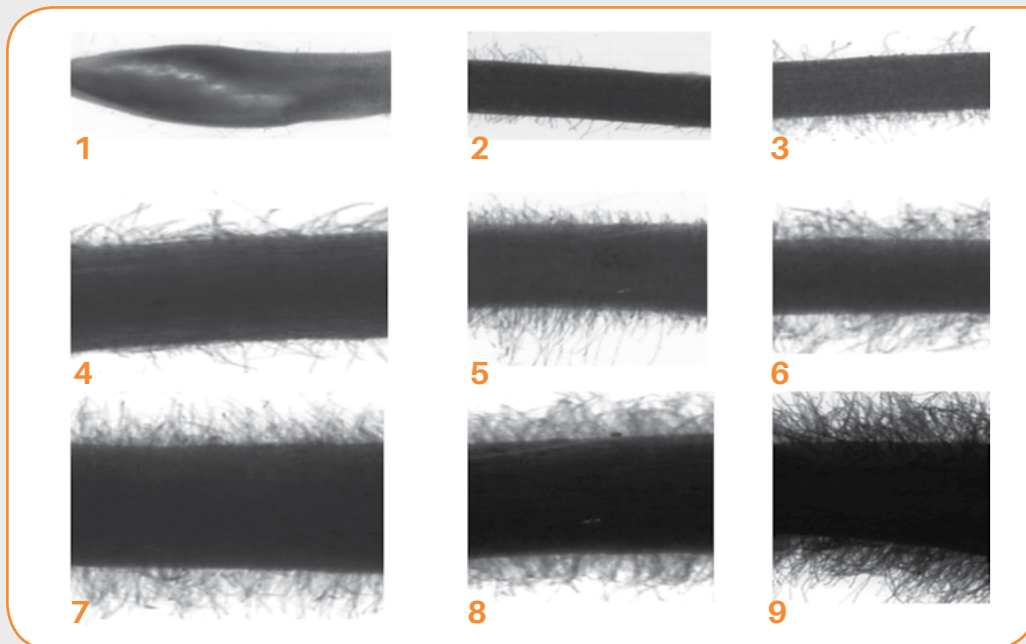


Figura 2. Escala usada para evaluar densidad de pelos de raíces en genotipos de frijol común.

Nota:

Los autores de este apartado son Jaumer Ricaurte, Martín Otero, Jarden Molina, Stephen Beebe e Idupulapati M. Rao.

 **Referencias**

- Batjes NH. 2011. Global distribution of soil phosphorus retention potential. Wageningen, Plant Research International (PRI), Wageningen UR and ISRIC World Soil Information. Report 6, 42.
- Jungk A. 2001. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 21-129.
- Rao IM; Ribet J; Beebe S; Ricaurte J. 1997. Identify plant traits and mechanisms for tolerance to low P. In: Bean Project, Annual Report 1997. Working document No. 177. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Regent Instruments Inc 2007. WinRHIZO basic, reg & pro 2007 a,b,c,d for washed root measurements. Quebec, Canada: Regent Instruments Inc.
- Vieira RF; Jochua CN; Lynch JP. 2007. Method for evaluation of root hairs of common bean genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(9):1365-1368.
- Yan X; Liao H; Beebe SE; Blair MW; Lynch JP. 2004. QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant Soil* 265:17-29.
- Zhu J; Zhang, C; Lynch, JP. 2010. The utility of phenotypic plasticity of root hair length for phosphorus acquisition. *Functional Plant Biology* 37(4):313-322. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/FP09197>

 **CONTACTOS****Jaumer Ricaurte**j.ricaurte@cgiar.org**Idupulapati M. Rao**i.rao@cgiar.org

Metodología para evaluar genotipos de frijol en soluciones nutritivas con alto aluminio

Introducción

Los suelos ácidos cubren alrededor del 85% de la región central de Suramérica tropical (40% Oxisoles, 26% Ultisoles, 1,5% Spodosoles, <1% Histosoles, 13% grandes grupos ácidos de Entisoles y 4,5% grandes grupos ácidos de Inceptisoles). En esta región, 358,6 Mha tienen niveles tóxicos de aluminio (Al) con más del 70% de saturación (Cochrane, 1991). Los suelos ácidos del Trópico, altamente intemperizados, se caracterizan por una combinación de deficiencias nutricionales y toxicidad de minerales. En estos suelos ácidos, la fitotoxicidad por Al es la principal limitación para la producción agrícola. (Rao et al., 1993).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante en América Latina tropical y en el oriente y sur de África (Beebe et al., 2013). Su producción en el trópico se ve afectada por factores abióticos de estrés entre los que se incluye sequía, calor, deficiencias de

nitrógeno y fósforo, las toxicidades por aluminio y manganeso en suelos ácidos (Rao et al., 1998; Beebe et al., 2013). El CIAT y sus socios han buscado desarrollar genotipos de frijol común adaptados a estos limitantes abióticos principales. La caracterización fenotípica de la adaptación de las raíces a suelos infértiles está posibilitando a los mejoradores el desarrollo de cultivares mejorados, no solo con mayores rendimientos, sino también con contribuciones a la estabilidad de los rendimientos y a la seguridad nutricional para enfrentar la variabilidad climática (Rao et al., 2016). En el CIAT se adaptó una metodología confiable, rápida y sencilla para la evaluación de genotipos de frijol con mejor resistencia a Al (Ricaurte et al., 2006; Rangel et al., 2008), desarrollada por Rangel et al. (2005a; b) y que ha contribuido a identificar genotipos de frijol con resistencia a Al en solución (Rangel et al., 2007a; Butare et al., 2012).

Principio

La respuesta inicial de las plantas a niveles altos de aluminio (Al) está relacionada con la inhibición de la división celular en los meristemos apicales (Marschner, 1995), la inhibición de la elongación (Rangel et al., 2007b) y el engrosamiento del sistema de raíces (Klotz and Horst, 1988; Rao et al., 2001; Wenzl et al., 2006). La severidad de la inhibición del crecimiento de las raíces es un indicador adecuado de las diferencias genotípicas en toxicidad por Al (Marschner, 1995). La fitotoxicidad del Al sobre las raíces está no solo relacionada con su concentración, sino particularmente con las especies de Al en el suelo y la concentración de los componentes orgánicos e inorgánicos formando complejos con el Al (Marschner, 1995).

Una evaluación realista de la adaptación de las plantas a suelos ácidos tropicales con Al alto requiere simultáneamente niveles tóxicos de Al y limitación por deficiencia de nutrientes (Wenzl et al., 2003; Rao et al., 2008; Khan et al., 2015). El frijol, este es sensible a la disminución del pH en la solución nutritiva de 5,0 a 4,5, lo cual se refleja en la producción de biomasa de las raíces y en la parte aérea de la planta (Gómez Laverde, 1993). El frijol es sensible a la disminución del pH en la solución nutritiva de 5,0 a 4,5 para la producción de biomasa de raíces y parte aérea de la planta (Gómez Laverde, 1993) y muy sensible a la disminución de pH entre 4,5 a 4,3, con una alta variación genotípica en sensibilidad protónica, por lo tanto la toxicidad protónica no permite la selección de genotipos de frijol por resistencia a Al (Rangel et al., 2005a).

Metodología

Esta metodología, desarrollada por Rangel et al. (2005a; b), comprende tres etapas. Una primera en la que se obtienen plántulas enraizadas, una segunda en la que se adaptan las plantas al pH de la solución y una tercera en la que se evalúan las plántulas enraizadas en solución sin y con Al alto (Figura 1).



Figura 1. Método de selección para resistencia a Al en solución en genotipos de frijol en tres etapas, bajo invernadero. Obtención de plántulas con sistema de raíces principal y basal, normalmente entre 4-5 días en el CIAT-Palmira bajo invernadero (A-B). Adaptación de plántulas a bajo pH en la solución (C). Prueba de tolerancia a Al, durante 24 horas, con la evaluación de longitud y diámetro promedio del sistema de raíces, usando imágenes escaneadas y analizadas con el programa WinRHIZO (E-F).

Obtención de plántulas enraizadas

Para ello, se seleccionan semillas de tamaño homogéneo de cada genotipo, se desinfectan con hipoclorito de calcio al 2,8% por 5 minutos y se lavan con abundante agua desionizada (para remover el hipoclorito).

- En caso de semillas de testa dura (p. ej., *P. coccineus*), estas deben ser escarificadas con un corte de bisturí sobre la testa y puestas a germinación con dos días de anticipación.
- Las semillas se ponen a germinar en un sistema de emparedado que requiere los siguientes materiales:
 - 2 láminas de PVC o acrílico (3 mm de espesor, 38cm de longitud y 24 cm de altura)
 - 4 láminas de espuma (1 cm de espesor, 38 cm de longitud y 24 cm de altura)

6 láminas de papel para germinar, del tamaño de la espuma

3 bandas elásticas

- Para la construcción del emparedado, primero se coloca una de las láminas de PVC sobre la que se sobrepone una lámina de espuma humedecida, previamente, con agua corriente y escurrida. Es relevante no dejar las láminas de espuma muy húmedas para evitar daños futuros en las raíces. A continuación, se coloca una lámina de papel de germinación humedecido, con anterioridad, con agua corriente y se procede a ubicar las semillas sobre este. Cada semilla se coloca a 2 cm del borde superior del papel de germinación, equidistantes entre sí, en posición horizontal con el hilo hacia abajo. Se debe procurar que el rafe (punto negro) de todas las semillas quede en la misma dirección para evitar la unión de las radículas una vez germinadas. El número de semillas puede variar entre 10 y 12 por cada línea de germinación. Después, se cubren las semillas con otra hoja de papel de germinación, previamente humedecido, tratando de lograr un buen contacto del papel en el sitio donde están ubicadas las semillas. Seguido de otra lámina de espuma, humedecida con anterioridad. El proceso se repite hasta completar un emparedado de tres líneas de semillas. Al final, se coloca la segunda lámina de PVC sobre la última lámina de espuma. El sistema completo es fijado en la parte inferior con 2 bandas elásticas y una tercera en la parte superior, a la altura de la parte inferior de las líneas de semillas.
- El emparedado completo se coloca en forma vertical dentro de una bandeja que contiene una lámina de 3 cm de agua corriente.
- A continuación, las bandejas se colocan en el invernadero cubiertas con bandejas plásticas perforadas para evitar la desecación superior del emparedado.
- Las plantas germinan durante un período de 4 a 5 días. Períodos más largos permiten la obtención de plántulas con mayor número de raíces laterales. Sin embargo, esto dificulta su posterior trasplante a la solución nutritiva.



Figura 2. Germinación de semillas de frijol (*Phaseolus* sp.) en un sistema de emparedado para la evaluación y selección de genotipos por resistencia a niveles altos de aluminio. A la izquierda, la colocación de las semillas sobre el papel de germinación humedecido y un emparedado donde se usa una lámina de PVC de 3 mm de grosor, espuma "espumflex calibre 23 blanco", papel de germinación. A la derecha la colocación de emparedados dentro de bandejas con lámina de agua corriente de 3 cm.

Establecimiento de los ensayos en invernadero

- Se acondicionan recipientes con capacidad de 20 l, forradas internamente con bolsas plásticas negras (Figura 1-C). Se preparan 16 l de solución nutritiva (Tabla 1) ajustada a pH 5,5. Para ajustar el pH de la solución, se puede usar una solución de HCl 0,1 M.
- La solución debe ser aireada continuamente, por medio de un soplador, que impulsa el aire ambiental por una tubería plástica a cada uno de los recipientes. Se debe tener la precaución de controlar el tamaño de las burbujas en cada recipiente para evitar el daño de las raíces.
- Dentro de cada recipiente, se coloca una bandeja alveolar con 40 cavidades tubulares. Las plantas se sujetan por la base del tallo, al interior de cada alvéolo, con una espuma negra cilíndrica de 4 cm de diámetro y 1 cm de espesor.
- Es importante que la solución nutritiva esté preparada, dentro de los recipientes en el invernadero, con 4 a 6 h de antelación al trasplante para minimizar cambios bruscos de temperatura a las plantas.

Tabla 1. Solución nutritiva para el enraizamiento y evaluación de plántulas de frijol (*P. vulgaris*) por su resistencia al aluminio.

Compuesto	Concentración
CaCl ₂ ·H ₂ O	5 mM
KCl	0,5 mM
H ₃ BO ₃	8 μM

Adaptación de las plántulas a la solución ácida con pH 4,5

- Después de 18 a 24 h de adaptación de las plántulas a la solución nutritiva, estas son sometidas a un período de adaptación a las condiciones ácidas (pH bajo) requeridas para todo estudio de toxicidad por Al.
- Esta adaptación consiste en bajar gradualmente el pH de la solución (0,3 a 0,5 unidades de pH cada 2 o 3 h) usando una solución HCl 0,1 M (Tabla 2).
- Las plantas deben permanecer por lo menos 4 a 6 h en un pH cerca de 4,5 antes del tratamiento con Al.
- Las plantas de frijol tienden a disminuir el pH de la solución en respuesta a la absorción de los cationes (p. ej., Ca y K). Es necesario controlar el pH con la adición de KOH 0,1 M para evitar disminuciones de pH por debajo de 4,4. El frijol es sensible a altas concentraciones de protones en la solución.

Tabla 2. Ajuste del pH de la solución nutritiva para la adaptación de las plántulas de frijol (*P. vulgaris* L.) a pH cercano a 4,5.

Tiempo	0 h	3 h	6 h	9 h
pH	5,5	5,2	4,9	4,6

Establecimiento de los tratamientos

- Se deben preparar recipientes limpios de 20 l, forrados en su interior con bolsa plástica negra (Figura 1-C). Preparar 16 l de solución nutritiva (Tabla 1) por cada recipiente.

- En el caso de los recipientes que no contienen Al (controles), la solución nutritiva debe ser ajustada a pH 4,5 (utilizar HCl 0,1 M).
- Para los recipientes que van a recibir los tratamientos de Al (p. ej., 20 μM Al), se debe ajustar el pH de la solución a 4,7 o 4,6. De esta forma, al momento de agregar el Al, esta quedará a un pH de 4,5. Esto debe ser calibrado para cada concentración de Al que se quiera obtener.
- Luego de concluido el período de adaptación al pH, se establecen parejas de plántulas sanas y homogéneas en parte aérea y raíz, ubicando una en solución con Al y la otra en solución sin Al. Para evaluar la tasa de elongación de la raíz principal, se pueden usar dos opciones:
- Opción 1: La raíz principal de cada planta es medida con una regla milimétrica y se colocan posteriormente en los diferentes tratamientos (0 y 20 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a pH 4,5.
- Opción 2: La raíz principal es marcada con un marcador azul permanente (*Sharpie-fine point*, Stanford, FL) 3 cm por encima de la punta de la raíz. Esta marca debe ser realizada 2 horas antes del inicio de los tratamientos para controlar posibles daños en las raíces, y permitir la recuperación de las tasas normales de crecimiento radicular después de la marcación.
- Dos horas después, se mide el crecimiento nuevo y se colocan en los diferentes tratamientos (0 y 20 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a pH 4,5.

Cosecha

Después de completadas 24 h de exposición a los tratamientos, se mide la longitud de la raíz principal (a partir de la base si se hizo la opción 1, o a partir del sitio marcado si fue la opción 2 la seleccionada al inicio de los tratamientos). La medición debe hacerse en mm por planta.

Posteriormente, se colectan las raíces en bolsas plásticas previamente marcadas de acuerdo con el libro de campo. De inmediato, se conservan en hielo para almacenarlas luego en nevera a 4 °C mientras se escanean en el menor tiempo posible. La parte aérea es colocada en bolsas de papel para secado en horno (60 °C) hasta alcanzar un peso constante (normalmente es obtenido al cabo de 48 horas). A continuación, se pesan en una balanza con precisión de 0,001 g.

Las raíces, una vez escaneadas y evaluadas su longitud y diámetro promedio, deben pasarse a bolsas de papel, secarse a 60 °C (48 h) y pesarse con balanza de precisión 0,001 g.

Análisis con WinRHIZO

Para obtener los valores de longitud y diámetro promedio del sistema de raíces, es necesario tener un sistema que cuantifique esos valores de forma precisa, exacta y ágil. La precisión se refiere a la dispersión de los datos obtenidos en las repeticiones de un análisis, así como a la exactitud del ajuste (mayor o menor) que tengan los resultados con respecto al valor real del sistema o medio cuantificado (Salinas y García, 1985). Del mismo modo, la agilidad es necesaria cuando se evalúa un número alto de genotipos.

En el CIAT-Palmira, para obtener imágenes de raíces, se eligieron equipos “Epson” (Epson *Expression* 1680, 10 000XL, 11 000XL), compatibles con el programa de computador “WinRHIZO” (versiones 2003b, pro 2007d) de “Regent Instruments” para el análisis de ese tipo de imágenes (Regent Instruments Inc, 2003, 2007).

Los escáneres seleccionados permiten obtener una imagen de alta calidad sin necesidad de realizar una tinción de las raíces y, al ser compatibles con el programa “WinRHIZO”, agilizan la evaluación

de genotipos de frijol sin y con Al en solución. Una buena imagen en el escáner Epson *Expression* 1680, antes mencionado, se puede lograr con las opciones: “mode: professional; document type: transparency; film type: positive film; image type: 16 bit grayscale; resolution: 200 a 300 dpi; target size: original; Scale: 100%”.

Las imágenes de las raíces se pueden analizar con el programa “WinRHIZO” que en las versiones que ofrece mide, entre otras, variables morfológicas de la raíz (Tabla 3). En el CIAT-Palmira, para la evaluación de sistemas de raíces – con y sin Al en solución – se analiza la imagen completa para establecer la longitud total y el diámetro promedio: dos variables morfológicas afectadas por altos contenidos de Al en la solución.

Según el tratamiento, los resultados se pueden presentar en tablas y/o gráficos donde se muestren los genotipos con los valores de longitud y diámetro promedio. Este tipo de información permite comparar el vigor del sistema de raíces sin Al y los efectos del aluminio sobre la longitud y engrosamiento de las raíces.

Tabla 3. Variables morfológicas medidas por versiones del programa “WinRHIZO” en imágenes escaneadas de raíces.*

Medida de la morfología de la raíz	Versión “WinRHIZO”			
	“Basic”	“Reg”	“Pro”	“Arabid”
Global (para la imagen completa)				
Longitud total	Sí	Sí	Sí	Sí
Diámetro promedio	Sí	Sí	Sí	Sí
Área total	Sí	Sí	Sí	Sí
Número de puntas, ramificaciones y cruces	Sí	Sí	Sí	Sí
Conteo manual de nódulos (no automático)	Sí	Sí	Sí	Sí
En función del diámetro de raíz (clasificado por diámetro)				
Longitud		Sí	Sí	Sí
Área, volumen		Sí	Sí	Sí
Número de puntas		Sí	Sí	Sí
En función del color de la raíz				
Longitud			Sí	Sí
Área, volumen			Sí	Sí
Número de puntas			Sí	Sí
Arquitectura de raíz con dimensiones fractales				
Arquitectura con dimensiones fractales			Sí	Sí
Análisis de colores				
Análisis de colores			Sí	Sí

* Adaptado de www.regentinstruments.com/assets/winrhizo_software.html

Nota:

Los autores de este apartado son Jaumer Ricaurte, Martín Otero, Jarden Molina, Stephen Beebe e Idupulapati M. Rao.

Referencias

- Beebe S; Rao IM; Mukankusi C; Buruchara R. 2013. Improving resource use efficiency and reducing risk of common bean production in Africa, Latin America, and the Caribbean. En: Hershey CH; Neate P (Eds.). *Eco-Efficiency: From Vision to Reality*. 1st ed. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp. 117-134.
- Butare L; Rao IM; Lepoivre P; Cajiao C; Polanía J; Cuasquer J; Beebe S. 2012. Phenotypic evaluation of interspecific recombinant inbred lines (RILs) of *Phaseolus* species for aluminium resistance and shoot and root growth response to aluminium-toxic acid soil. *Euphytica* 186(3):715-730.
- Cochrane TT. 1991. Understanding and managing acid soils of Tropical South America. En: Deturk P; Ponnamperna FN (Eds.). *Rice production on acid soils of the tropics*. Kandy, Sri Lanka: Institute of Fundamental Studies. pp. 113-122.
- Gómez CR. 1993. Tolerancia de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al pH ácido y al aluminio y efecto de estos factores sobre la fijación de nitrógeno. *Rev. Colomb. Química* 22(2):69-80.
- Khan MSH; Wagatsuma T; Akhter A; Rao IM. 2015. Differences among rice cultivars in their adaptation to low ionic strength solution with toxic level of aluminum that mimics tropical acid soil conditions. *J. Plant Nutr.* 38(13):1973-1983.
- Klotz F; Horst WJ. 1988. Genotypic differences in aluminium tolerance of soybean (*Glycine max* L.) as affected by ammonium and nitrate-nitrogen nutrition. *J. Plant Physiol.* 132(6):702-707.
- Marschner H. 1995. Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions. En: Marschner H. (Ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd ed. Elsevier Ltd. pp. 596-680.
- Rangel AF; Mobin M; Rao IM; Horst WJ. 2005a. Proton toxicity interferes with the screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for aluminium resistance in nutrient solution. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168:607-616.
- Rangel AF; Rao IM; Horst WJ. 2005b. Short and medium-term root-growth responses to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). 2001: 2004.
- Rangel AF; Rao IM; Horst WJ. 2007a. Short- and medium-term root-growth responses to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In *CIAT beans outcome line (SBA-3) Annual Report (2007)*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Rangel AF; Rao IM; Horst WJ. 2007b. Spatial aluminium sensitivity of root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with contrasting aluminium resistance. *J. Exp. Bot.* 58(14):3895-3904.
- Rangel AF; Ricaurte J; Beebe S; Rao IM, Horst HG. 2008. Improving phenotyping capacity to evaluate for aluminum resistance. In: *Annual Report 2008, Outcome Line SBA-1, Improved Beans for the Developing World Product 2: Beans that are more productive in smallholder systems of poor farmers*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Rao IM; Zeigler RS; Vera R; Sarkarung S. 1993. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *Bioscience* 43(7): 454-465.
- Rao IM; Ribet J; Beebe S; Ricaurte J. 1998. Identify plant traits and mechanisms for tolerance to low P. In: *CIAT, Bean projects IP-1 and IP-2 Annual Report 1997*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Rao IM; Miles JW; Wenzl P; García R; Ricaurte J. 2001. Identification of Al-resistant *Brachiaria* hybrids. In: *Annual Report 2001 Project IP-5 Tropical Grasses and Legumes: Optimizing genetic diversity for multipurpose use*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. pp. 110-112.

- Rao IM; Wenzl P; Arango A; Miles J; Watanabe T; Shinano T; Osaki M; Wagatsuma T; Manrique G; Beebe S; Tohme J; Ishitani M; Rangel A; Horst W. 2008. Advances in developing screening methods and improving aluminum resistance in common bean and *Brachiaria*. R. Bras. Agrocencia 14(4):1-7.
- Rao IM; Miles JW; Beebe SE; Horst WJ. 2016. Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity. Disponible en <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/75628>
- Regent Instruments Inc. 2003. WinRHIZO basic, reg & pro for washed root measurements. Quebec, Canada: Regent Instruments Inc.
- Regent Instruments Inc. 2003. WinRHIZO basic, reg & pro 2007 a,b,c,d for washed root measurements. Quebec, Canada: Regent Instruments inc.
- Ricaurte J; García R; Rao IM; Beebe S. 2006. Development of a single screening method using nutrient solution to identify aluminum resistant common bean genotypes. En: Annual Report 2006, Project IP 1, Bean Improvement for the Tropics. Cali, Colombia.
- Salinas JG; García R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.
- Wenzl P. Mancilla LL; Mayer JE; Albert R; Rao IM. 2003. Simulating infertile acid soils with nutrient solutions: the effects on *Brachiaria* species. Soil Sci. Soc. Am. J. 67: 1457-1469.
- Wenzl P; Arango A; Chaves AL; Buitrago ME; Patiño GM; Miles J; Rao IM. 2006. A greenhouse method to screen *Brachiaria* grass genotypes for aluminum resistance and root vigor. Crop Sci. 46: 968-976.

✉ CONTACTOS
Jaumer Ricaurte
j.ricaurte@cgiar.org
Idupulapati Rao
i.rao@cgiar.org

Determinación de proteína (método Bradford)

Adaptada para mediciones en material vegetal (hojas) de forrajes

Introducción

Las proteínas son moléculas orgánicas esenciales. Están conformadas por aminoácidos (unidades químicas) que son los responsables de la formación, conservación, reparación, desarrollo y crecimiento de los tejidos en los organismos vivos. Estas moléculas están compuestas por cientos o miles de aminoácidos que conforman largas cadenas unidas por enlaces.

Cada tipo de proteína posee una secuencia específica de aminoácidos elaborados por cada organismo o que deben ser tomados del medio natural. Estos últimos se conocen como aminoácidos esenciales y son ocho: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.

Dada la relevancia de las proteínas, su valoración en un extracto vegetal es importante al evaluar los cambios metabólicos, en general, de una planta; Además, es fundamental para la determinación de actividades enzimáticas específicas (Melgarejo, 2010). Un proceso simple para estimar el contenido de proteína fue descrito por Marion M. Bradford; este consiste en un procedimiento espectroscópico usado para medir la concentración de proteína en una solución. Es un procedimiento subjetivo, es decir, depende de la composición de los aminoácidos de la proteína medida.

Principio

El método Bradford consiste en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie G-250 con la proteína (reactivo Bradford). La fijación del tinte a proteína causa un cambio en el máximo de absorción del colorante (desde 465 a 595 nm) y es este aumento de absorción a 595 nm el que se mide. El ensayo es rápido y reproducible; el proceso de coloración completo ocurre en aproximadamente 2 minutos con una estabilidad del color de 1 hora.

Hay poca o ninguna interferencia de cationes como sodio o potasio, ni de carbohidratos tales como sacarosa. Una pequeña cantidad de color se desarrolla en presencia de los agentes tampón, fuertemente alcalinos, pero el ensayo puede funcionar con precisión al usar controles tampón adecuados.

Los únicos componentes que pueden ocasionar interferencia en el color son cantidades relativamente grandes de detergentes tales como dodecil sulfato de sodio, Triton X-100 y los de uso comercial en el lavado de la cristalería, lo cual puede ser eliminado con el uso de muestras control.

Equipo

- Centrífuga
- Agitador de tubos (vortex)
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Fosfato dibásico de potasio K_2HPO_4
- Fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- *Quick Start*TM Bradford 1x *Dye Reagent* 99.3%
- Gamma globulina (2 mg/ml)



Preparación de soluciones

Buffer fosfato (extracción) (100 mM fosfato, 0,1 mM EDTA) (pH 6,8):

Pese 1,362 g KH_2PO_4 , 0,693 g K_2HPO_4 y 3,72 mg EDTA y adiciónelos a un volumen de 100 ml con agua milli-Q o agua bidestilada.

Quick Start™ Bradford 1x *Dye Reagent* (reactivo de Bradford)

Curva de calibración

Realice los estándares (Tabla 1) con gamma globulina 2 mg/ml, la cual tiene un rango lineal de 125–1500 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 1. Curva de calibración.

Tubo No.	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)"	Gamma globulina	Volumen estándar (μl)	Volumen dilución buffer fosfato (μl)
1	2000	2 mg/ml Stock	20	0
2	1500	2 mg/ml Stock	30	10
3	1000	2 mg/ml Stock	20	20
4	750	Tubo 2	20	20
5	500	Tubo 3	20	20
6	250	Tubo 5	20	20
7	125	Tubo 6	20	20
8	0		0	20

①→②→③→ Procedimiento

1. Pese 50 mg de tejido vegetal y adicione 2 ml de buffer extracción (100 mM fosfato, 0,1 mM EDTA) frío (pH 6,8).
2. Homogenice en vortex por 60 segundos.
3. Filtre con la ayuda de una jeringa de 5 ml y un filtro.
4. Centrifugue el filtrado a 4 °C, 11 000 rpm por 15 minutos. Trabaje con el sobrenadante.

Determinación de proteína

1. Pipetee 5 μl de cada estándar y de la muestra desconocida en pozos del microplato.
2. Utilice una pipeta *multichannel* y adicione 250 μl del reactivo de Bradford 1x; presione repetidas veces para mezclar las muestras y los estándares con el reactivo.
3. Incube a temperatura ambiente por 10 min en una mezcladora de microplatos a 800 rpm (no deje incubar más de una hora).
4. Lea las absorbancias a 595 nm.

Cálculos de preparación de las soluciones

Buffer extracción EDTA 0,1 mM

$$100 \text{ ml sln buffer} \times \frac{0,1 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{372,24 \text{ mg EDTA}}{1 \text{ mmol EDTA}} = 3,72 \text{ mg EDTA}$$

Buffer fosfato pH 6,8

$$\log \frac{[A^-]}{[HA]} = \text{pH} - \text{pKa} = 6,8 - 7,2$$

$$10^{\log \frac{[A^-]}{[HA]}} = 10^{-0,4}$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 0,398$$

$$[A^-] = 0,398 \times [HA]$$

$$100 \text{ ml} \times \frac{100 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{136,17 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 1,362 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,398 \times 100 \text{ ml} \times \frac{100 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{174,18 \text{ mg K}_2\text{HPO}_4}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,693 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$



Resultados

Al graficar los valores de absorbancia a 595 nm (eje y) vs. la concentración en $\mu\text{g/ml}$ (eje x), se crea una curva estándar. Después, al realizar una ecuación de regresión se determinan las concentraciones de las muestras desconocidas.

Nota:

Metodología adaptada en el Laboratorio de Calidad Nutricional del CIAT por Daniela Chamorro, estudiante de Química de la Universidad del Valle (Cali), durante su práctica en el año 2014.

Referencias

Bradford M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Melgarejo L. (Ed). 2010. *Experimentos en Fisiología Vegetal*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

CONTACTOS

Juan Andrés Cardoso

j.a.cardoso@cgjar.org

Juan de la Cruz Jiménez

j.c.jimenez@cgjar.org

Determinación de la actividad de la catalasa

Adaptada para mediciones en material vegetal (hojas) de forrajes

Introducción

La catalasa es una enzima que se encuentra en muchos organismos vivos. Esta cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

El peróxido de hidrógeno es uno de los productos del metabolismo celular en diversos organismos, pero dada su toxicidad potencial es transformado, enseguida, por la enzima catalasa.

Principio

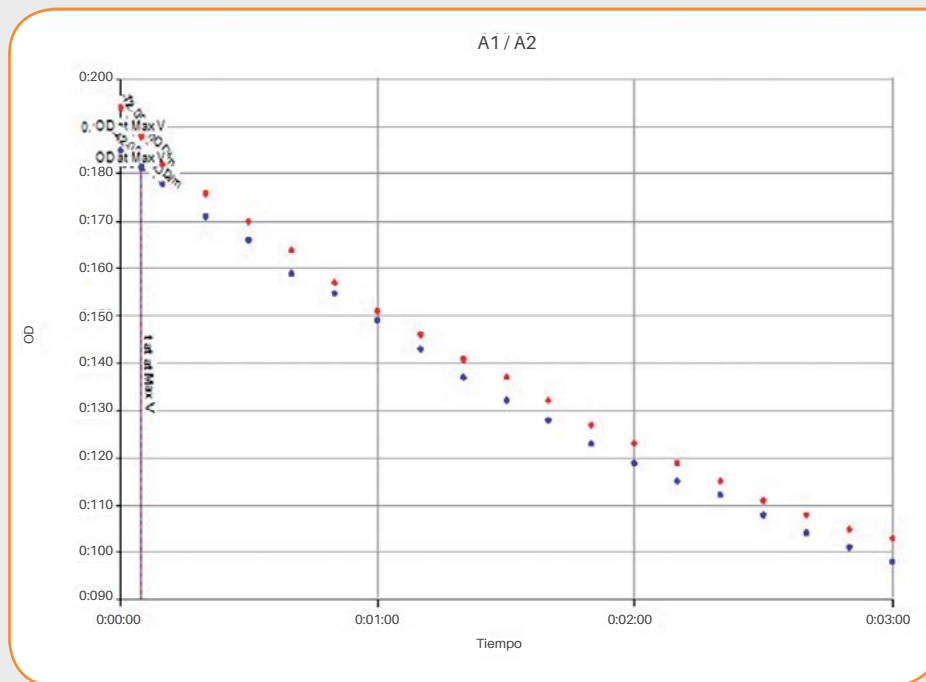
Según Beers (1952) y Luck (1965), la actividad de la catalasa se determina después de la oxidación de H_2O_2 a 240 nm. Dicha actividad se establece a partir de la medida de la disminución en la absorbancia a 240 nm (a 30 °C, 60 segundos después).

Equipo

- Agitador de tubos (vortex)
- Centrífuga
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Fosfato dibásico de potasio K_2HPO_4
- Fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Peróxido de hidrógeno H_2O_2



Curva de tiempo vs OD.



Preparación de soluciones

Buffer extracción pH 6,8 – (Concentración 100 mM fosfato, 0,1 mM EDTA). Adicione: 1,362 g KH_2PO_4 , 0,693 g K_2HPO_4 y 3,72 mg EDTA en 100 ml de agua milli-Q o bidestilada.

Buffer reacción pH 7,0 – (Concentración 50 mM fosfato y 5 mM H_2O_2)

Adicione 680,85 mg KH_2PO_4 , 549,5 mg K_2HPO_4 y 51,1 μl H_2O_2 en 50 ml de agua milli-Q o bidestilada.

① → ② → ③ → Procedimiento

Tratamiento de la muestra

1. Pese 50 mg de muestra.
2. Adicione 2 ml de buffer extracción frío (pH 6,8).
3. Homogenice en vortex por 60 segundos.
4. Filtre con ayuda de una jeringa de 5 ml con filtro.
5. Centrifugue el filtrado a 4 °C, 11 000 rpm por 15 minutos. Trabaje con el sobrenadante.

La actividad de la catalasa se determina después de la oxidación de H_2O_2 a 240 nm:

1. Adicione 50 μl del sobrenadante a 2950 μl del buffer pH 7.
2. La actividad se determina por la medida de la disminución en la absorbancia a 240 nm, a 30 °C después de 60 segundos.

Cálculos

Buffer extracción

EDTA 0,1 mM

$$100 \text{ ml sln buffer} \times \frac{0,1 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{372,24 \text{ mg EDTA}}{1 \text{ mmol EDTA}} = 3,72 \text{ mg EDTA}$$

Buffer fosfato pH 6,8

$$\log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \text{pH} - \text{pKa} = 6,8 - 7,2$$

$$10^{\log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}} = 10^{-0,4}$$

$$\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = 0,398$$

$$[\text{A}^-] = 0,398 \times [\text{HA}]$$

$$100 \text{ ml} \times \frac{100 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{136,17 \text{ mg } \text{KH}_2\text{PO}_4}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 1,362 \text{ g } \text{KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,398 \times 100 \text{ ml} \times \frac{100 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{174,18 \text{ mg } \text{K}_2\text{HPO}_4}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,693 \text{ g } \text{K}_2\text{HPO}_4$$

Buffer reacción

H₂O₂ 5 mM

$$50 \text{ ml sln buffer} \times \frac{5 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{34,01 \text{ mg H}_2\text{O}_2}{1 \text{ mmol H}_2\text{O}_2} \times \frac{1 \text{ g H}_2\text{O}_2}{1000 \text{ mg H}_2\text{O}_2} \times \frac{100 \text{ g}}{30 \text{ g H}_2\text{O}_2} \times \frac{1 \text{ ml}}{1,11 \text{ g}}$$
$$= 0,0255 \text{ ml H}_2\text{O}_2$$

Buffer fosfato 50 mM

$$\log \frac{[A^-]}{[HA]} = \text{pH} - \text{pKa} = 7 - 7,2$$

$$10^{\log \frac{[A^-]}{[HA]}} = 10^{-0,2}$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 0,631$$

$$[A^-] = 0,631 \times [HA]$$

$$50 \text{ ml} \times \frac{50 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{136,17 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4}{1 \text{ mmol}} = 680,85 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4$$

$$0,631 \times 50 \text{ ml} \times \frac{50 \text{ mmol}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{174,18 \text{ mg K}_2\text{HPO}_4}{1 \text{ mmol}} = 549,5 \text{ mg K}_2\text{HPO}_4$$



Resultados

El resultado se expresa como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \cdot \text{mg}$ y, para ello, primero se halla la actividad enzimática. Esta se define como la transformación de 1 μmol de producto por minuto durante la reacción enzimática. En términos bioquímicos, dicha actividad enzimática se expresa por unidad de volumen, esto es, en U/ml.

$$\Delta C = (U/ml) \cdot T \quad (\text{Ec. 1})$$

Al sustituir la Ec. 1 en la ecuación de Lambert-Beer ($A = \epsilon bC$) y despejando U/ml, se obtiene.

$$U/ml = \Delta A / \epsilon bT \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

- U Unidad de actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
- ΔA Cambio de absorbancia del compuesto
- ϵ Absortividad molar del H₂O₂ ($0,036 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$)
- b Espesor de la cubeta en cm
- T Tiempo en min
- ΔC Cambio de concentración del compuesto (μmol)

Además, el valor resultante U/ml debe multiplicarse por el volumen de la cubeta y la dilución final.

Para obtener la actividad específica de la catalasa en U/mg ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \cdot \text{mg}$), se divide dicha actividad (U/ml) entre la concentración de proteínas (mg/ml) (ver protocolo para Determinación de Proteína en pág. 158).

Nota:

Metodología adaptada en el Laboratorio de Calidad Nutricional del CIAT por Daniela Chamorro, estudiante de Química de la Universidad del Valle, durante su práctica en 2014.

 **Referencias**

Beers RF; Sizer IW. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 195:133-140.

Li Y; Schellhorn HE. 2007. Rapid kinetic microassay for catalase activity. J. Biomol. Tech. 18:185-187.

Luck H. 1965. Catalase. En: Bergmeyer HU. Ed. Methods of Enzymatic Analysis. New York, USA. Academic Press. pp. 885-894.

 **CONTACTOS**

Juan Andrés Cardoso

j.a.cardoso@cgiar.org

Juan de la Cruz Jiménez

j.c.jimenez@cgiar.org

Determinación de la actividad antioxidante por DPPH

Adaptada para mediciones en material vegetal (hojas) de forrajes

Introducción

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Así, un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Para estimar dicha actividad antioxidante, se usa el reactivo DPPH. De este

modo, el método se basa en la reducción de la absorbancia medida a 520 nm del radical DPPH por antioxidantes contenidos en los alimentos. Los resultados se expresan en TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox).

Principio

Este método se utiliza para cuantificar la actividad antioxidante en una muestra previamente liofilizada y pulverizada, con un estándar de Trolox: un análogo de la vitamina E.

Equipo

- Balanza analítica
- Baño María
- Centrífuga
- Agitador (tubos y microplacas)
- Espectrofotómetro
- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf 1,5 y 2 ml ámbar

Reactivos

Nombre	Nombre con especificaciones
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O (Sigma-Aldrich D9132)
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Aldrich 238813)
Etanol	Ethanol C ₂ H ₆ O (Sigma-Aldrich; E7023)
Acetona	Acetone C ₃ H ₆ O (Sigma-Aldrich; 650501)
Agua	Agua 18 MΩ o bidestilada

Procedimiento

Preparación de las muestras y las soluciones

Tratamiento de las muestras

Todas deben ser cortadas, almacenadas a -20 °C y molidas finamente.

Preparación de la solución extractora

La solución extractora se prepara al mezclar 70 ml de acetona con 30 ml de agua, para una solución (7:3).

Preparación de la solución stock de Trolox

Para preparar el stock de 4 mM, se pesa 25 mg de Trolox y se completa hasta un volumen de 25 ml de solución extractora.

Preparación de la solución de DPPH

Para la solución madre, se adiciona 24 mg de DPPH a 10 ml de etanol. De esta solución, se toma una alícuota de 783 μ l y se disuelve en 30 ml de etanol. Se guardan las soluciones en nevera y a oscuras. Se debe preparar la solución "stock" semanalmente y se conserva a -20 °C.

Curva de calibración

Con la solución stock, se preparan las siguientes soluciones estándar:

Estándar	Trolox (μ M)	Vol. stock (μ l)	Vol. sln. extractora (μ l)	Vol. total (μ l)
1	0	0	1000	1000
2	0,8	200	800	1000
3	1,6	400	600	1000
4	2,4	600	400	1000
5	3,2	800	200	1000
6	4	1000	0	1000

Preparación de la muestra

El tratamiento para las muestras es el siguiente:

- De las muestras liofilizadas y molidas, se pesan 0,25 g por triplicado en un tubo Falcón de 15 ml.
- Se agregan 5 ml de la solución extractora.
- Se agita cada muestra (vortex) por 10 segundos.
- Los tubos Falcón se agitan suavemente por 30 min. Es necesario cerciorarse que la solución se agite de forma homogénea y que la tapa esté bien cerrada.
- Se lleva a la centrifuga por 10 min a 6000 rpm.
- Se extrae 1 ml de la solución obtenida y se lleva a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.

Lectura de la actividad antioxidante en las muestras

Tanto para las muestras extraídas como para los estándares de la curva de calibración, se realiza el mismo procedimiento:

- Se agregan 25 μ l de la muestra (diluida) o del estándar. Se utiliza como blanco la solución extractora.
- Se adicionan 2 ml de la solución de DPPH.
- Se deja incubar 30 minutos a oscuras y se agita levemente en un agitador multiplacas.
- 300 μ l de las soluciones ya coloreadas se llevan, por triplicado, al plato de 96 pozos.
- Se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 517 y a 520 nm.

Cálculo

Para calcular la capacidad antioxidante, se utiliza la siguiente ecuación de acuerdo con la curva de calibración:

$$y = mx + b$$

Donde, y = absorbancia m = pendiente
 x = [muestra] (μM) b = corte de la curva

Así, (x) es la concentración de la muestra en equivalente a Trolox, y (y) es la absorbancia obtenida.

Disposición de residuos

Los desechos obtenidos después del análisis de la actividad antioxidante se deben vertir en un recipiente aparte marcado, de forma adecuada, como “material de desecho de antioxidantes” para su tratamiento posterior.

Luego, el material de vidrio debe lavarse con abundante agua para evitar que quede algún tipo de residuo, y con etanol para el caso de los platos.

Nota:

Metodología adaptada en el Laboratorio de Calidad Nutricional del CIAT por Daniela Chamorro, estudiante de Química de la Universidad del Valle (Cali) en práctica durante el 2014.

Referencias

Ao C; Li A; Elzaawely A; Xuan T; Tawata S. 2008. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. Food Control 19:940-948.

Du G; Li M; Ma F; Liang D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. Food Chemistry 113:557-562.

CONTACTOS

Juan Andrés Cardoso

j.a.cardoso@cgiar.org

Juan de la Cruz Jiménez

j.c.jimenez@cgiar.org

Determinación de la actividad antioxidante por ABTS

Adaptada para mediciones en material vegetal (hojas) de forrajes

Introducción

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Así, un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Un método para determinar la actividad antioxidante es utilizando el reactivo ABTS. Este se basa en la reacción del catión radical $ABTS^+$ y los compuestos antioxidantes contenidos en los alimentos capaces de captar este radical y llevarlo nuevamente a su estado neutro.

El reactivo utilizado como estándar para realizar la cuantificación de antioxidantes en el alimento es Trolox, un análogo de la vitamina E.

La formación del catión radical $ABTS^+$ se realiza utilizando persulfato de potasio como oxidante del compuesto neutro, mostrando una absorción máxima a 734 nm, la cual disminuye proporcionalmente al interactuar con muestras antioxidantes. Para la curva de calibración, es necesario cambiar los datos de absorbancia a porcentaje de inhibición. Para ello, se realizan todos los análisis a una concentración inicial determinada del radical.

Principio

Este método se utiliza para cuantificar la actividad antioxidante en un alimento previamente liofilizado y pulverizado. Se emplea un estándar de Trolox, un análogo de la vitamina E.

Equipo

- Congelador
- Liofilizador
- Agitador de placas y de tubos
- Nevera
- Molino
- Espectrofotómetro

Reactivos

Nombre	Nombre con especificaciones
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich; 1888)
Persulfato de potasio	Potassium persulfate $K_2O_8S_2$ (Sigma-Aldrich; 379824)
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Aldrich 238813)
Etanol	Ethanol C_2H_6O (Sigma-Aldrich; E7023)
Acetona	Acetone C_3H_6O (Sigma-Aldrich; 650501)

①→②→③→ Procedimiento

Preparación de las muestras y las soluciones

Tratamiento de las muestras

Todas las muestras deben ser cortadas, congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizadas y molidas finamente.

Preparación de la solución extractora

La solución extractora se prepara al mezclar 70 ml de acetona con 30 ml de agua, para obtener una solución (7:3).

Preparación de la solución stock de Trolox

Se pesan 25 mg de Trolox y se lleva hasta un volumen de 10 ml con solución extractora para la preparación del "stock" de 10 mM. De este primer "stock", se realiza una dilución para obtener 10 ml de 0,5 mM. Para ello, se retira de la solución inicial 0,5 ml y se lleva hasta un volumen de 10 ml con solución extractora. Este "stock" final es el utilizado para la curva de calibración.

Preparación del radical catión ABTS⁺

Se pesan 38,4 mg de ABTS y 6,6 mg de peroxidisulfato de potasio (persulfato de potasio). Se llevan juntos hasta un volumen de 10 ml con agua 18 MΩ. Se guarda en la nevera a oscuras por 16 horas.

Al momento de realizar las cuantificaciones, la solución debe diluirse al tomar una alícuota de 180 μL en 10 ml de solución extractora a un rango de absorbancia final de $1,00 \pm 0,07$ (valor de la absorbancia 734 nm). En este paso, hay que verificar que esté dando esta absorbancia, de lo contrario, se afecta la determinación en el espectrofotómetro.

La solución del radical catión ABTS⁺ se debe mantener aislada de la luz hasta su utilización, porque puede sufrir una degradación debido a los rayos lumínicos y a los diferentes compuestos en el aire. La solución "stock" debe prepararse semanalmente y guardarse a 4 °C.

Preparación de la curva estándar de calibración de Trolox

Con la solución "stock" preparada anteriormente, se hacen las siguientes soluciones estándar:

Estándar	Trolox (μM)	Vol. stock (μl)	Vol. sln. extractora (μl)	Vol. total (μl)
1	0	0	1000	1000
2	50	100	900	1000
3	100	200	800	1000
4	200	400	600	1000
5	300	600	400	1000
6	400	800	200	1000

Preparación de la muestra

El tratamiento para las muestras es el siguiente:

- De las muestras liofilizadas y molidas, se pesan 0,5 g por triplicado. Estas son colocadas en un tubo Falcón de 50 ml.
- Se agrega 5 ml de la solución extractora.

- c) Cada muestra se mezcla bien en un agitador vortex durante 10 segundos.
- d) Los tubos Falcón se colocan en un agitador por 30 minutos. Se agitan, con suavidad, cerciorándose de que la solución se agite de forma homogénea y que la tapa esté bien cerrada.
- e) Se lleva a la centrifuga durante 10 min a 6000 rpm.
- f) Se extrae 1 ml de la solución obtenida y se lleva a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- g) Es necesario realizar una dilución de la solución obtenida a (1:9). Para ello, se toman 100 μl de la muestra y se agregan 900 μl de la solución de extracción.

Lectura de la actividad antioxidante en las muestras

Tanto para las muestras extraídas (diluidas) como para los estándares de la curva de calibración, se realiza el mismo procedimiento:

- a) Los análisis se realizan directamente en el plato de 96 pozos por triplicado, ya que la reacción es muy rápida.
- b) Se agrega 30 μl a cada pozo de la muestra (diluida) o del estándar.
- c) Se adicionan 300 μl de la solución radical ABTS⁺ previamente diluida a $1,00 \pm 0,07$ del valor de la absorbancia (ver preparación del radical catión ABTS⁺).
- d) Se deja incubar por 6 minutos en la oscuridad. Se agita levemente en el agitador multiplacas.
- e) Se mide la absorbancia a 734 nm.

Cálculos

Para calcular el porcentaje de inhibición, es necesario cambiar los datos de absorbancia utilizando el factor $[(A_0 - A_t) \times 100]$; donde, A_0 es la absorbancia inicial ($1,00 \pm 0,07$ A) y A_t es la absorbancia obtenida para cada estándar o muestra correspondiente en el análisis.

La concentración de la muestra se calcula según la ecuación en la curva de calibración. Donde (x) es la concentración de la muestra, y (y) es la absorbancia obtenida.

$$y = mx + b \quad \text{Donde:} \quad y = \% \text{ Inhibición} \quad m = \text{pendiente de la curva}$$

$$x = [\text{muestra}] (\mu\text{M}) \quad b = \text{corte de la curva}$$

Después, para obtener la concentración de los compuestos antioxidantes en la muestra (materia seca), la concentración obtenida por la curva de calibración se multiplica por el factor de dilución (generalmente para muestras de plátano se diluye 5 μl a 1000 μl). Este resultado se multiplica por el volumen de la solución extractora y se divide por el peso total de la muestra, así:

$$\frac{\mu\text{mol Trolox}}{\text{g muestra DM}} = [\text{muestra}] \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \times (\text{factor de dilución}) \times \left(\frac{0,005 \text{ l}}{0,5 \text{ g}} \right)$$

$$\frac{\mu\text{mol Trolox}}{\text{g muestra DM}} = [\text{muestra}] \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \times \left(\frac{1000 \mu\text{l}}{50 \mu\text{l}} \right) \times \left(\frac{0,005 \text{ l}}{0,5 \text{ g}} \right)$$

Limpieza y descarte de desechos

Los desechos obtenidos después del análisis de la actividad antioxidante se deben verter en un recipiente aparte. Este debe estar etiquetado como “material de desecho de polifenoles” para su posterior tratamiento.

Luego, el material de vidrio debe lavarse con abundante agua para evitar que quede algún tipo de residuo, y con etanol para el caso de los platos.

Nota:

Metodología adaptada en el Laboratorio de Calidad Nutricional del CIAT por Daniela Chamorro, estudiante de Química de la Universidad del Valle (Cali) en práctica durante el 2014.

Referencias

Ao C; Li A; Elzaawely A; Xuan T; Tawata S. 2008. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. Food Control 19:940-948.

Du G; Li M; Ma F; Liang D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with olyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. Food Chemistry 113:557-562.

CONTACTOS

Juan Andrés Cardoso

j.a.cardoso@cgiar.org

Juan de la Cruz Jiménez

j.c.jimenez@cgiar.org

Determinación del potencial IBN a través del bioensayo

Introducción

Se han identificado diferentes especies de plantas que desde sus raíces exudan al suelo compuestos que inhiben la nitrificación. Esta propiedad vegetal se ha denominado inhibición biológica de la nitrificación (IBN) y es de gran potencial para favorecer el aprovechamiento del nitrógeno por parte de los cultivos agrícolas. Por esta razón, ha comenzado a estudiarse en detalle en los últimos años.

El IBN es un tipo de interacción planta microorganismo que es afectado por múltiples factores presentes en el suelo y en la planta. Para facilitar su estudio, se ha logrado acondicionar

un sistema in vivo que permite cuantificar el efecto de los exudados radicales o extractos de tejido sobre un microorganismo nitrificante, denominado bioensayo. Originalmente el bioensayo fue propuesto para evaluar el efecto de inhibidores sintéticos de la nitrificación en plantas de tratamiento de aguas residuales, después fue acondicionado para cuantificar el efecto de los exudados de *Brachiaria* y otros cultivos en la actividad de un microorganismo nitrificante. Desde entonces, el bioensayo se ha establecido como la herramienta para medir el potencial IBN de los cultivos.

Principio

El bioensayo permite cuantificar a través de un sistema in vivo el efecto inhibitor de compuestos con potencial IBN sobre la enzima amoA. Esta enzima es un componente clave en la nitrificación que está presente en los microorganismos autotróficos que usan el amonio como fuente de energía.

El bioensayo consiste en el uso de una cepa de *Nitrosomas europaea* que ha sido modificada genéticamente con el gen pluxAB. Este gen codifica para la enzima luciferasa que produce una reacción de quimioluminiscencia y le brinda a este microorganismo la capacidad de emitir luz. Esta emisión de luz puede ser cuantificada con un luminómetro y expresada como porcentaje de inhibición, ya que la luz disminuye si la bacteria es inhibida.

Se ha propuesto que el flujo de energía necesario para el funcionamiento de la luciferasa proviene de la oxidación del amonio (primer paso de la nitrificación realizado por la enzima amoA). Si esta reacción se interrumpe por efecto de un inhibidor, se observa la subsecuente disminución de la luz (Izumi et al., 1998). Esta observación se complementa con la correlación significativa entre la inhibición de la luz y la inhibición de la producción de nitrito (producto final de la nitrificación), lo que sugiere que la disminución de la luz corresponde a la disminución de la actividad de amoA (Subbarao et al., 2006).

Equipo

- Luminómetro
- Agitador de tubos
- Liofilizador
- Horno
- Rotoevaporador
- *Speedvac*
- Centrífuga

Reactivos

Metanol	CH ₃ OH
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄
Fosfato de sodio	Na ₂ HPO ₄
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ · 2H ₂ O
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O
Ácido etilendiaminotetraacético hierro (III) sal de sodio	Fe (III)-EDTA
Cloruro de calcio	CaCl ₂
Decaldehído (Decanal)	
Dimetil sulfóxido (DMSO)	
Clorato de amonio	NH ₄ Cl ₂
Cepa de <i>Nitrosomonas</i> recombinante	
Allylthiourea	
Kanamicina 50mg/ml	

Preparación de soluciones

1. Preparación del medio de P

- Añada los reactivos (Tabla 1) a 900 ml de agua destilada.
- Ajuste a pH to 7,8 con HCL 1 N.
- Complete hasta el volumen de 1 litro.
- Lleve a autoclave.

2. Preparación de decaldehído 1%

- Diluya 500 µl de decanal en 49,5 ml de etanol absoluto.
- Deje a temperatura ambiente por 15 min.

Tabla 1. Reactivos.

Reactivo	Fórmula	Preparar previamente	Añadir a 900 mL de agua destilada
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	No aplica	0,70 g
Fosfato de sodio	Na ₂ HPO ₄	No aplica	13,5 g
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	100 g/l	25 ml
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	20 g/l	25 ml
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 g/l	1 ml
Sulfato de magnesio	Mg SO ₄ · 7H ₂ O	10 g/l	1 ml
Ácido etilendiaminotetraacético hierro (III) sal de sodio	Fe(III)-EDTA	1 g/l	1 ml

①→②→③→ Procedimiento

Obtención de compuestos IBN de exudados radicales

1. Extraiga las plantas del medio (p. ej., suelo, arena:suelo, agar, solución nutritiva) y lávelas cuidadosamente. Evite dañar las raíces (cualquier daño en la raíz puede llevar a sobreestimaciones del potencial IBN).
2. Ponga el sistema radical en una solución trampa de 500 ml de NH_4Cl_2 1 mM y CaCl_2 200 μM durante 24 horas en aireación continua. Cubra el recipiente con una bolsa oscura para mantener las raíces sin luz.
3. Después de las 24 horas de exudación, tome las plantas y séquelas durante dos días a 60 °C en un horno. Registre el peso seco de la parte aérea y de las raíces.
4. Filtre la solución con un papel *Whatman* número 2 y liofilice 150 ml de esta solución.
5. Resuspenda los exudados secos en 50 ml de metanol.
6. Seque el extracto metanólico en un rotoevaporador a 40 °C, resuspenda nuevamente en 2 ml de metanol y fíltrelo a través de un filtro de 0,22 μm adaptado a una jeringa. Recupere la solución filtrada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
7. Seque la muestra nuevamente en un *speedvac* a temperatura ambiente. Una vez seco, resuspenda la totalidad de la muestra en 50 μl de DMSO.
8. Use 2 μl de esta para el bioensayo.

Obtención de compuestos IBN de extracto de raíz

1. Extraiga las plantas del medio (p. ej., suelo, arena:suelo, agar, solución nutritiva) y lávelas cuidadosamente evitando el daño de las raíces (cualquier daño puede llevar a sobreestimaciones del potencial IBN).
2. *Opción A:* con ayuda de nitrógeno líquido, macere las raíces en un mortero hasta obtener un polvo fino. Liofilice para quitar humedad.
3. *Opción B:* seque las plantas en un horno a 60 °C por dos días. Una vez secas las raíces, molerlas hasta obtener un polvo fino.
4. Tome 100 mg de polvo fino de raíz en un tubo Eppendorf de 2 ml, añada 1,5 ml de metanol y tres balines de 1 mm. Agite vigorosamente durante 10 minutos en un agitador de tubos (tipo vortex). Deje los tubos a temperatura durante 15 minutos para separar los residuos de raíz del extracto metanólico.
5. Tome 1 ml del extracto de metanol y fíltrelo con un filtro de 0,22 μm adaptado a una jeringa. Recupere la solución filtrada en un Eppendorf de 1,5 ml.
6. Seque la muestra en un *speedvac* a temperatura ambiente. Una vez seco, por completo, resuspenda la muestra en 50 μl de DMSO.
7. Use 2 μl de esta muestra para el bioensayo.

Bioensayo

1. Active la cepa de *Nitrosomonas* recombinante durante siete días a 50 RPM y 28 °C bajo la oscuridad. Use un Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio P más 25 μl del “stock” de *Nitrosomonas* almacenado a -80 °C. Agregue 100 μl de kanamicina 50 mg/ml.
2. Una vez pasados siete días, separe los 200 ml de cultivo en 4 tubos Falcón de 50 ml y centrifugue a 3500 rpm durante 20 min. Descarte el sobrenadante siguiendo los protocolos de bioseguridad.* Recupere el pellet con bacterias (debe verse de color naranja) y únalos en un tubo Falcon nuevo. Resuspenda en 50 ml de medio P. Cubra con una bolsa negra y mantenga a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Para evaluar la estabilidad de la bacteria, añada, en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, 2 μl de DMSO, 198 μl de agua destilada y 250 μl de la bacteria (**tratamiento DMSO**). En un tubo diferente, añada 200 μl de agua destilada y 250 μl de la bacteria (**tratamiento control**). Incube las muestras a 15 °C a 900 rpm durante 15 minutos. Use 100 μl de estas muestras para cuantificar la luminiscencia con el luminómetro (4 réplicas por cada tratamiento). Para considerar una bacteria óptima para el bioensayo, el coeficiente de variación CV entre réplicas debe ser menor al 5%.
4. Para evaluar el efecto del inhibidor sintético allylthiourea y así estimar las unidades en las que se expresan el potencial IBN (unidades de allylthiourea ATU), prepare una mezcla con 0,22 μM de AT en 200 μl de agua destilada y 250 μl de bacteria. Incube las muestras a 15 °C a 900 rpm durante 15 minutos. Use 100 μl de estas muestras para cuantificar la luminiscencia con el luminómetro con 4 réplicas. La inhibición de 0,22 μM de AT debe estar cercana al 80%, comparada con el tratamiento control, para considerar una bacteria óptima para el bioensayo.
5. Repita el paso 3 y 4, al menos dos veces al día, para verificar la estabilidad de la bacteria.
6. Para la estimación del potencial IBN, use: 2 μl de exudado/extracto de raíz, 198 μl de agua destilada y 250 μl de bacteria. Incube las muestras a 15 °C a 900 rpm durante 15 minutos. Use 100 μl de estas muestras para cuantificar la luminiscencia con el luminómetro usando 4 réplicas. El porcentaje de inhibición se calcula de acuerdo a la luminiscencia del tratamiento DMSO. La transformación a unidades ATU se hace considerando que el 80% de la inhibición es igual a 1 ATU.

* Se debe descartar en bolsa roja y posteriormente llevar a autoclave.

Uso del luminómetro

1. Los valores de luminiscencia se expresan como unidades de luz relativas (RLU). Los RLU corresponden a un tiempo de integración a partir de los 2 segundos después de la inyección hasta 10 segundos después de inyectar 25 μl de decilaldehído 1%. Se debe seleccionar el protocolo IT-BNI, que está ajustado con los parámetros antes mencionados (el luminómetro que opera en el Laboratorio de Biología Molecular y Ambiental del CIAT es un Glomax 20/20 con sistema de inyección).
2. Encienda el luminómetro. Confirme la conexión apropiada con el PC. Haga click en el ícono del Glomax, presione *start* y se abrirá un documento Excel.
3. Purgue los inyectores antes de empezar cualquier protocolo que requiera de autoinyección. Para esto, ponga en el contenedor 5 ml de decilaldehído 1% en el panel *touch* del luminómetro; presione “Inj Func” y seleccione la función “*prime*”. Cada ciclo de purga mueve alrededor de

1000 μ l a través del sistema de inyectores. Por lo tanto, debe poner debajo del inyector un tubo Eppendorf vacío para recibir el volumen de decilaldehído que pasa por el sistema.

4. Una vez purgado el inyector, toque “Protocol” en la pantalla y seleccione el protocolo ITBNI.
5. Inserte la muestra (paso 6 protocolo del bioensayo) en el luminómetro. Cierre la tapa y toque “Measure Luminescence” en la pantalla.
6. Los datos resultantes en RLU se muestran en el luminómetro y en el archivo Excel.
7. Limpie los inyectores después de usarlos. Para esto, toque “Inj Func” y presione *flush*.

Ponga un contenedor de desechos para capturar el volumen. Para una mejor limpieza, aplique un ciclo de agua destilada seguido por un ciclo de etanol al 70%. Finalice con otro ciclo de agua destilada.


8. Apague el luminómetro.

Referencias

Iizumi T; Mizumoto M; Nakamura K. 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10):3656–3662.

Núñez J. 2015. Potencial de inhibición biológica de la nitrificación en forrajes tropicales (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

Subbarao GV; Ishikawa T; Ito O; Nakahara K; Wang HY; Berry WL. 2006. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant and Soil* 288:101–112.

 CONTACTOS
Jacobo Arango
j.arango@cgjar.org
Jonathan Núñez
j.n.potes@cgjar.org

Cuantificación de microorganismos por métodos moleculares

Introducción

Los avances en la genómica del suelo han permitido caracterizar diversas enzimas que juegan un rol importante en muchos de los procesos biogeoquímicos que regulan la disponibilidad de nutrientes importantes para las plantas. Cada vez son más detallados los perfiles de la dinámica de los microorganismos que realizan dichos procesos complementándose con los perfiles bioquímicos clásicos. En los años recientes, se han diseñado estrategias cada vez más precisas que permiten conocer la ecología de los microorganismos

del suelo en diferentes ámbitos, entre ellos, la acumulación de carbono en el suelo, mineralización de la materia orgánica, el ciclo del nitrógeno y su influencia sobre la emisión de importantes gases de efecto invernadero. Por dichas razones, cuantificar la abundancia y determinar la diversidad de especies de microorganismos específicos en el suelo permite comprender su papel en la interacción planta-microorganismos, con miras a una agricultura ecoeficiente y sostenible.

Principio

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real permite cuantificar el número de copias de un gen en una muestra dada. En este contexto, si se realiza la cuantificación de un gen específico para un grupo de microorganismos del suelo (p. ej., nitrificantes, archaeas y bacterias totales, reductores de azufre, etc.), se puede obtener un número de copias de un gen que representa la abundancia de un microorganismo dado. Por lo tanto, bajo un diseño experimental adecuado, se puede inferir acerca de la dinámica del microorganismo evaluado entre diversos tratamientos.

La robustez de esta técnica se basa en la selección del gen específico adecuado que permita una cuantificación del grupo de microorganismos de interés con el uso de cebadores o primers específicos. Los cebadores de PCR apropiados pueden derivar de estudios previos o, bien, pueden ser obtenidos a partir de análisis bioinformáticos usando las secuencias reportadas de los genes y/o microorganismos de interés. La fuente de información del número de copias de un gen dado es el ADN; por lo tanto, es necesario un método de extracción de ADN apropiado para la PCR a partir del suelo.

Equipo

- Centrífuga
- qPCR Realplex – Eppendorf
- Nanodrop



Reactivos

- *FastDNA SPIN* Kit para suelo (MP Biomedicals)
- Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- Tiocianato de guanidina 5,5 M
- *Sybr green brilliant kit*
- T4 DNA polimerasa

① → ② → ③ → Procedimiento

Extracción de ADN (Modificación del kit MPBio)

1. Añada 500 mg de suelo seco al tubo de *Lysing Matrix E* y registre el peso exacto de lo que usó.
2. Adicione 978 μ l del buffer de fosfato de sodio y 122 μ l MT buffer.
3. Asegure los tubos en un agitador de tubos y agítelos durante 3 min.
4. Centrifugue a 16 200 x g durante 1 minuto.
5. Transfiera el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 ml. Añada 250 μ l del reactivo PPS y mezcle suavemente por agitación manual 10 veces.
6. Centrifugue a 16 200 x g durante 5 minutos.
7. Transfiera el sobrenadante a un tubo de 2 ml. Resuspenda la *Binding Matrix* usando un vortex y agregue 1 ml al sobrenadante.
8. Invierta manualmente durante 2 min para permitir que el ADN se una a la matriz. Deje los tubos en una gradilla durante 3 min para que la matriz de sílica se precipite.
9. Descarte 500 μ l del sobrenadante, con suavidad, evite tocar la matriz de sílica precipitada. Resuspenda la matriz en el volumen remanente.
10. Transfiera 750 μ l de la mezcla a un *SPIN Filter*, centrifugue a 14 000 x g por 1 min. Descarte el tubo de colecta, añada el resto de matriz de sílica al *SPIN Filter* y centrifugue nuevamente.
11. Si el suelo tiene alto contenido de ácidos húmicos (color café), realice un paso de lavado extra con 500 μ L de tiocianato de guanidina 5,5 M. Centrifugue a 14 000 x g por 1 min. Descarte lo que queda en el tubo de colecta y repita.
12. Agregue 500 μ l de buffer SEWS-M al *SPIN Filter* y centrifugue a 16 200 x g por 1 min. Descarte lo que queda en el tubo de colecta y repita.
13. Centrifugue el *SPIN-Filter* a 16 200 x g por 2 min para secar los residuos de buffer SEWS-M.
14. Remueva el *SPIN Filter* y póngalo en un tubo nuevo de recuperación. Deje secar a temperatura ambiente el *SPIN Filter* por 5 min.
15. Agregue 50 μ l de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) y suavemente resuspenda la matriz dentro del filtro con una pipeta.
16. Centrifugue a 14 000 x g por 1 min para transferir el ADN al tubo de recuperación. Descarte el *SPIN Filter*.

17. El ADN está listo para usarse y almacenar a -20 °C.

Cuantificación del ADN

Use 2 μl para cuantificar el ADN por absorbancia en un nanodrop siguiendo las indicaciones para ácidos nucleicos. Asimismo, registre el valor de absorbancia para 310 nm, ya que este representa el contenido de ácidos húmicos en la muestra. La concentración final debe ser corregida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ng}/\mu\text{l} = (\text{Abs}260 - \text{Abs}310) - (\text{Abs}280 - \text{Abs}310) / 0,2$$

Una vez determine la cantidad de ADN obtenida por muestra en $\text{ng}/\mu\text{l}$, haga una dilución de las muestras para obtener una concentración final de 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Use 2 μl de esta dilución para qPCR.

Cuantificación por qPCR

Este protocolo está diseñado para la cuantificación de archaeas (AOA) nitrificantes del suelo. Para esto, se usa el gen *amoA* como marcador en una máquina de *real time realplex* de Promega. Según sean los microorganismos que se vayan a cuantificar, el protocolo puede variar en el perfil térmico de la PCR, la concentración final de los *primers* o la inclusión de otros reactivos.

Por tal razón, la cuantificación absoluta del número de copias depende de una curva estándar que se construye con una dilución seriada de plásmidos que contienen el fragmento del gen que se va a utilizar como marcador.

Para el caso de las archaeas nitrificantes, en un volumen final de 20 μl con 20 ng de ADN de suelo, agregue 0,5 μM de cada *primer* y 10 μl del *Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix*. El control negativo o *No Template Control* (NTC) consiste en agua en vez de ADN.

Las condiciones de amplificación de los genes para los nitrificantes son las siguientes:

1) 95 °C – 5 min; 2) 95 °C – 1,5 min; 3) 55 °C – 1,5 min; 4) 72 °C – 1,5 min; 5) lectura de la placa; 8) ir al paso 2 por 40 veces más; 9) curva de fusión desde 65 °C hasta 95 °C, leer cada 0,2 °C, mantener 1 segundo.

Se debe verificar que la eficiencia de amplificación sea mayor al 90% y la curva de fusión presente un pico esperado (de acuerdo a la curva estándar). Calcular el número de copias por kg de suelo.

Cuadro de *primers* utilizados para los diferentes microorganismos y genes usados en el Laboratorio de Biología Molecular y Ambiental.

Identificador	Secuencia 5-3	Gene	Microorganismo target
FungusFw	cgataacgaacgagacct	18 s	Hongos totales
FungusRv	anccattcaatcggtant		
Arch amoA Fw	staatggctggttagacg	amoA	Archaeas nitrificantes
Arch amoA Rv	gcgccatccatctgtatgt		
16s Arch fw	ackgctcagtaaacgt	16 s	Archaeas totales
16s Arch Rv	ctccccgccaattccttta		
16s Bac Fw	attaccgggctgctgg	16s	Bacterias totales
16s Bac Rv	acctacgggaggcagcag		
Bac AmoA Fw	ggggttttactggtgt	amoA	Bacterias nitrificantes
Bac AmoA Rv	ccccrckgsaaagccttcttc		

 CONTACTOS

Jacobo Arango

j.arango@cgjar.org

Jonathan Núñez

j.n.potes@cgjar.org



Capítulo 6

Políticas institucionales sobre riesgo químico y manejo de información

Gestión del riesgo químico

Introducción

En abril del 2014, la oficina de Salud Ocupacional, apoyada por el Dr. Joe Tomme, lanzó el Programa para la Gestión del Riesgo Químico. La justificación principal fue el desarrollar un programa de alta efectividad para la gestión del riesgo químico debido a sus efectos sobre la salud a largo plazo. En el CIAT, se cuenta con un gran número y diversidad de laboratorios, variedad de reactivos y procesos analíticos que fácilmente se convierten en un riesgo, a este nivel, en el panorama de riesgo general.

Objetivo

Proyectar un programa de gestión de riesgo químico que permita en 5 años (2014–2019) la conformación de una cultura de autocuidado como el elemento principal en la prevención y, así, garantizar un ambiente sano para los colaboradores.

El programa se dividió en varias etapas (cada etapa para cada año):

1. Cimentación y estructuración
2. Divulgación y consolidación
3. Sostenimiento
4. Mejoramiento
5. Reconocimiento

Hasta el momento, se han llevado a cabo las dos primeras etapas donde se realizaron jornadas de sensibilización con todo el personal de laboratorio y de profundización en manejo del riesgo químico (identificación de líderes). Se realizó la actualización del diagnóstico, la matriz del riesgo químico, la identificación, separación y almacenamiento de productos químicos.

En 2016, se realizó el levantamiento de los estándares de gestión de riesgo químico en cada laboratorio y se definieron los indicadores del programa. Posteriormente, se planea la divulgación y consolidación al cumplir con visitas cruzadas a los laboratorios y campañas de publicidad.

Para la etapa de sostenimiento, los asesores llevarán a cabo seguimiento a las desviaciones observadas en las visitas y a los indicadores de gestión.

En la etapa de mejoramiento, se plantea: sensibilizar al personal, seguir las desviaciones observadas en las visitas y los indicadores de gestión. Finalmente, en la etapa de reconocimiento, dar cierre al programa y presentar los indicadores de gestión.

Buenas prácticas del laboratorio

Con respecto a las buenas prácticas, se han aplicado las normas básicas de manejo en laboratorios y las aprendidas en las campañas realizadas por parte de la oficina de Salud Ocupacional del CIAT. Se aplican y se controlan los siguientes aspectos:

- Uso de la blusa y calzado adecuado para permanecer dentro del laboratorio.
- Uso del EPP (equipo de protección personal) según la labor.
- Registros de uso y reserva de equipos del laboratorio y anexos por parte de los usuarios.
- Registro y control de muestras que ingresan para análisis. Cuaderno de entrada y cuaderno de registro de datos, así como el cuaderno de registro diario.
- Cartelera Informativa interna.
- Uso del manual de protocolos a seguir por parte de analistas y estudiantes.

- Identificación de las áreas de trabajo y de los equipos (letreros).
- Almacenaje y etiquetado bajo cambio, según la instrucción recibida el año en el cual se aplicó el sistema SGA (sistema globalmente armonizado) de identificación y almacenaje de reactivos peligrosos, bajo la responsabilidad de los animadores de la divulgación y aplicación del sistema dentro del grupo.
- Chequeos periódicos de balanzas (cada 15 días) con el kit de pesas adquirido en el 2014 con los Laboratorios Unión Metrológica Ltda, y consta de:
 - Pesa de 500 g SB Serie 1501 M1 Calibrado 21918.
 - Pesa de 200 g Serie 1302 KERN F1 Calibrado 20499.
 - Pesa de 5 g Serie 1301 KERN E2 Calibrado 20500.
 - Pesa de 1 g Serie 1303 KERN F1 Calibrado 20498.
- Además:
 - Pesa de 100 g tolerancia +/- 0,1 mg (llegó con las balanzas de precisión), 2 unidades.
 - Pesa de 50 g E2 Mettler Me-216502.
 - Pesa de 2 kilos.
- Equipos de medición de temperatura y humedad HTC. Ubicación: LPN y cuarto de balanzas.
- Calibración externa de balanzas para certificación cada 1-2 años. Mantenimiento preventivo/correctivo a hornos, agitadores, neveras e incubadoras.
- El chequeo se realiza con una placa calibrada del equipo *Synergy HT* de espectrofotometría. Se efectúa una vez al año y se lleva registro. *Absorbance Test Plate Calibrate*. Serial 250449. Abril 2011.
- Capacitaciones mensuales al grupo de nutrición de plantas en temas relacionados a las labores realizadas y medidas de seguridad a nivel de campo, invernadero y laboratorios. Proyección de videos ilustrativos.

- En cada puerta (2), hay un extintor de agua y uno de CO₂ ubicados en la entrada al cuarto de digestión. Existe un gabinete externo (No. 11) con mangueras contraincendio. Internamente, existe un lavajos en la poceta auxiliar. Se lleva a cabo una inducción y supervisión permanente al personal que requiera laborar dentro del laboratorio, en particular, a los estudiantes.
- Interacción constante con todos los integrantes del equipo de Nutrición de Plantas.
- Firma de compromiso por parte de los estudiantes y/o visitantes en el cumplimiento de las normas de seguridad del laboratorio y de haber recibido la inducción.
- Se hace seguimiento al uso del cuarto de preparación de muestras de tejido, ubicado en el invernadero. Este se mantiene cerrado bajo llave y se lleva registro del préstamo de la misma.
- Se almacenan las muestras en el cuarto asignado en las bodegas (ZN-7G) y se mantienen selladas y codificadas hasta por un período de 5 años antes de descartarlas. Se registran las muestras que son retiradas por los solicitantes.
- Se implementó y se está aplicando el sistema de mejoramiento continuo 5" S". Cada mes, se hace el chequeo y se presentan avances. El equipo, en conjunto, ha adoptado este sistema para mantener las áreas limpias y organizadas.
- Se atienden visitas externas de estudiantes de universidades y visitantes en general, como parte de la misión de divulgación del CIAT.

Sistema de manejo de información

Los resultados de los análisis del laboratorio se entregan a los diferentes asistentes y/o asociados que los han solicitado. A su vez, estos los integran en sus bases de datos para efectuar los análisis estadísticos y obtener finalmente un documento con los resultados de la investigación.

La política de acceso abierto y gestión de datos del CIAT y CGIAR para hacer que los datos de su investigación agrícola queden disponibles y puedan ser utilizados por otros científicos y el público en

general es una iniciativa relativamente reciente que ya se encuentra en proceso de implementación. En línea con esta política institucional, se vió la necesidad de recopilar y organizar los datos históricos.

Con este fin, se creó un equipo nuevo de Gestión de Datos e Información, liderado por la Coordinación de Programas del Centro, encargado de compilar, organizar y centralizar los datos como un componente fundamental en la investigación científica. Gracias a esta labor, se ha avanzado en la recolección de datos que no solo estaban dispersos en diferentes ordenadores y servidores, sino también almacenados en formatos y archivos diferentes.

Esta labor se inició con el Programa de Yuca (equipo que cuenta con Lizbeth Pino, quien cumple el rol de mediación entre los requerimientos del programa y el equipo de gestión de datos) y continuó con Forrajes Tropicales, Arroz, Fríjol y Suelos. También se incluyó información ya codificada de proyectos y ensayos en África.

¿Cómo lo hacen?

Un componente valioso en este proceso de estandarización de datos es la ontología. Esta permite estandarizar los tipos de mediciones en los cultivos que sean comunes tanto en su método como en su escala. Dicha estandarización de la información de los cultivos posibilita la comparación de los datos con otros centros de investigación.

A su vez, los practicantes han contribuido a la *Integrated Breeding Platform* y su *Breeding Management System* (BMS). En particular, BMS ha sido diseñado para ayudar a los mejoradores a gestionar sus actividades diarias a través de todas las fases de sus programas de mejoramiento. Con BMS, todos los Centros de CGIAR pueden compartir la misma ontología.

Esto brinda la oportunidad de integrar información y así aprovechar los datos disponibles de las investigaciones realizadas a través de los años.

Desarrollo de software

Además de trabajar en el almacenamiento y difusión de los resultados de los procesos de investigación, y los proyectos desarrollados en el CIAT, los

practicantes del equipo de gestión de datos también han aportado al desarrollo y fortalecimiento de soluciones de *software* que se adecúan a las necesidades de las áreas de investigación. Por ejemplo, para atender el tema de transferencia de materiales, se diseñó hace algún tiempo uno para el acuerdo normalizado de transferencia de material (*Standard Material Transfer Agreement, SMTA*), que permite rastrear cualquier material de propagación vegetal que se trasfiera de un país a otro.

Ahora, con la política institucional de acceso abierto, hay una mayor conciencia y un liderazgo más fuerte que hace énfasis en la importancia de asegurar que los datos estén disponibles y sean accesibles. Por esto, la creación de este nuevo equipo, más cercano a los investigadores y con una mayor visibilidad dentro de la institución, se considera muy oportuna.

El desafío es que los datos de investigación del CIAT lleguen al mayor número de beneficiarios y maximizar su accesibilidad global e impacto potencial.

Para mayor información acerca del grupo de Gestión de Datos e Información del CIAT, contactar a:

 CONTACTOS

Leroy Mwanzia

Manager Gestión de Datos e Información

l.mwanzia@cgiar.org

Carolina García

Analista de Sistemas

c.garcia-ciat@cgiar.org

Paola Cruz

Analista de Sistemas

p.a.cruz@cgiar.org

Información de los autores

Gonzalo Antonio Borrero Tamayo

Bioquímico MSc Suelos
Asociado de Investigación
g.a.borrero@cgiar.org

Juan de la Cruz Jiménez Serna

Ing. Agrónomo Msc Fisiología
Asistente de Investigación
j.c.jimenez@cgiar.org

José Jaumer Ricaurte Oyola

Ing. Agrónomo MSc Suelos
Asociado de Investigación
j.ricaurte@cgiar.org

Mariela Rivera Peña

Ing. Agrónoma PhD Suelos
Asociada de Investigación
m.rivera@cgiar.org

José A. Polanía

PhD Biología y Biotecnología Vegetal
Asociado de Investigación
j.a.polania@cgiar.org

Jonathan Núñez Potes

Ing. Agrónomo MSc Fisiología
Asistente de Investigación
j.n.potes@cgiar.org

Norma Constanza Barbosa Torres

Ing. Agrónoma
Asistente de Investigación
n.c.barbosa@cgiar.org

Jacobo Arango Mejía

PhD Biólogo Molecular Ambiental
Científico Investigador
j.arango@cgiar.org

Juan Andrés Cardoso Arango

PhD Fisiología Vegetal
Investigador Posdoctoral
j.a.cardoso@cgiar.org

Idupulapati Rao

PhD Fisiología Vegetal
Científico Investigador
i.rao@cgiar.org

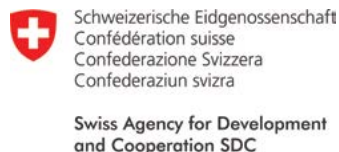


Agradecimientos

Especial agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia; la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica); la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (Cosude); la Agencia Sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo (ASDI); al Ministerio Federal Alemán para la Cooperación y el Desarrollo Económico (BMZ); la Agencia Alemana de Cooperación Internacional (GIZ); la Fundación Bill & Melinda Gates (BMGF); la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID); el Centro Internacional de Investigación para las Ciencias Agrícolas de Japón (JIRCAS); el Ministerio de Agricultura, Forestería y Pesca (MAFF) del Japón; el Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (Fontagro); DOW AgroSciences, Estados Unidos, por su aporte en la financiación de algunos de los proyectos difundidos en esta publicación.

A los asistentes y asociados de los Programas de Fríjol y Forrajes y del Área de Investigación en Agrodiversidad, por su colaboración en la entrega y revisión de protocolos. A todos los técnicos, trabajadores y colaboradores del área de Nutrición y Fisiología de Plantas, que con su valioso aporte han ayudado en realización y/o desarrollo de los mismos.

Este trabajo se llevó a cabo como parte del Programa de Investigación de CGIAR sobre Ganadería y Pesca. Agradecemos a todos los donantes que apoyan el trabajo del Programa a nivel mundial a través de sus aportes al Sistema CGIAR.



Diseño y diagramación

María Cristina Reyes y
Ximena Hiles Granada

Edición de producción

Katty Camacho y
Victoria Rengifo

Impresión

Velásquez Digital S.A.S.
Cali, Colombia



Centro Internacional de Agricultura Tropical
Desde 1967 *Ciencia para cultivar el cambio*

Centro de Investigación
de CGIAR

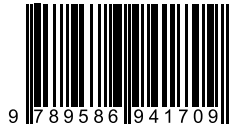
www.ciat.cgiar.org



CGIAR

www.cgiar.org

ISBN: 978-958-694-170-9



9 789586 194170 9