

## Caracterización agronomica de accesiones de *Azolla* de Venezuela

Y. Espinoza<sup>1</sup> y R. Gutierrez<sup>1‡</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Apdo. 4653 Maracay 2101. Venezuela.

‡Fallecido

### Resumen

Dada la importancia de la simbiosis *Azolla-anabaena* como fijadora de nitrógeno y su potencial uso como biofertilizante, se realizaron diez expediciones de muestreo durante 1991-1993, con el propósito de identificar y evaluar la productividad agronómica en *Azolla* nativa. Las accesiones fueron mantenidas en umbráculo luego de la recoleta. Se recolectaron en total 67 accesiones en todas las regiones muestreadas, de las cuales un 50% se encontraron en los estados Apure, Guárico y Portuguesa. Se identificaron 29 accesiones utilizando características morfológicas y anatómicas de la planta y de los órganos reproductivos. De las 43% accesiones identificadas, 35% pertenecen a *Azolla filiculoides*, 9% a *A. microphylla* y el resto (57%) no pudo ser determinada. La productividad de las recolectas se ubicó entre 250-1340 kg MS.ha<sup>-1</sup> y entre 13-40 kg N.ha<sup>-1</sup>. Las accesiones FONAIAP 1, 16, 22, 24, 31, 54 y 57 fueron identificadas como las más promisorias en razón de su tasa de fijación de nitrógeno, tasa relativa de crecimiento y tiempo de duplicación de la biomasa, para ser utilizadas como biofertilizante o suplemento animal. Sin embargo, la accesión FONAIAP 10 perteneciente a la especie *A. microphylla* fue la más eficiente en la utilización del fósforo.

**Palabras clave:** *Azolla*, biofertilizante, fijación simbiótica, tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, fósforo.

### Introducción

*Azolla* es un género de pequeños helechos acuáticos cuyos individuos son capaces de asociarse simbióticamente con el alga verde-azul fijadora de nitrógeno *Anabaena azollae*. Este género tiene un amplio

intervalo altitudinal de distribución desde el nivel del mar hasta 5.000 de altitud (11). En general, *Azolla* prefiere condiciones frías y semisombreadas y se desarrolla mejor en contenidos altos de fósforo, tan-

to en el agua como en el suelo.

Existen siete especies de *Azolla* ampliamente distribuidas a nivel mundial. Esta distribución ha sido fuertemente influenciada por el hombre, debido a la introducción indiscriminada del helecho de un área a otra. Previo a la dispersión humana, *A. caroliniana* fue reportada en América del Norte y el Caribe; *A. filiculoides* en Sur América y oeste mediterráneo, incluyendo a Alaska; *A. microphylla* en América tropical y subtropical; *A. mexicana* en el norte de Sur América y oeste de Norte América; *A. nilotica* desde el Nilo hasta Sudan; *A. pinnata* en Asia y costas de África Tropical; *A. japónica* en Japón (13). En Venezuela se ha reportado la presencia de *A. filiculoides*, (5) y *A. caroliniana*, (15).

De acuerdo a Becking (1) la fijación de nitrógeno de la simbiosis varía con el tipo de especie de *Azolla*. Sin embargo, Reynaud (20) y Watanabe *et al.* (29) encontraron que

los factores ambientales ejercieron gran influencia sobre esta capacidad y la de producción de grandes cantidades de biomasa. Tanto la fijación de nitrógeno como la alta tasa de crecimiento le permitieron producir en poco tiempo gran cantidad de biomasa rica en nitrógeno. Esta propiedad ha motivado su estudio como biofertilizante para cultivos desarrollados en condiciones de inundación (13, 29). El FONAIAP inició en 1991 un proyecto de investigación para evaluar la potencialidad de la asociación *Azolla-anabaena* como biofertilizante para arrozales venezolanos, para lo cual se planteó la necesidad de recolectar y desarrollar un banco de germoplasma de las especies de *Azolla* en Venezuela. Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar morfológica y anatómicamente, así como evaluar la productividad agronómica de accesiones de *Azolla-anabaena* de Venezuela.

## Materiales y métodos

Durante 1991 a 1993 se realizaron diez expediciones para recolectar especies de *Azolla* (figura 1). Las rutas fueron trazadas tratando de abarcar las áreas del país sujetas a inundaciones frecuentes, sistemas de riego y drenaje, campos de cultivo de arroz, lagos, ríos y esteros, ubicados en los estados Amazonas, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Cojedes, Delta Amacuro, Guárico, Lara, Mérida, Portuguesa y Zulia. Asimismo, los lugares donde se realizaron las colectas de *Azolla* fueron ubicados

geográficamente considerando la distancia al centro poblado más cercano. Las expediciones fueron realizadas durante la época lluviosa (mayo-octubre), cuando la disponibilidad de agua no fue un factor limitante.

En cada sitio donde se localizó el helecho, se tomaron muestras superficiales de suelo y agua para realizarle análisis químico. Las muestras de suelo luego de secadas al aire y tamizadas, se les determinó pH potenciométricamente en suspensión suelo:agua (1: 2,5), conductividad eléc-



**Figura 1. Recorrido realizado para las recolectas de *Azolla* en Venezuela**

trica (CE), P y K por el método de Olsen, (14), carbono orgánico por combustión húmeda (28) y calcio por el método de Mehlich-3 (12). Las muestras de agua fueron conservadas a 4°C hasta el momento del análisis. A cada una se les determinó el pH, conductividad eléctrica, P por colorimetría utilizando el método fosfovanadatomoibdato (9), K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn y Cu por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3100, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut). En el caso de Ca y Mg se usó lantano en HCl al 1%. Se determinó el contenido de nitrógeno utilizando el método Kjeldahl (4) utilizando un bloque digestor Tecator 40 modelo 1016 y un destilador automático

Tecator 1002 (Tecator, Hoganas, Suecia). Adicionalmente, se realizaron observaciones acerca de las características generales del área de recolecta, vegetación asociada y coloración del helecho. Cuando la población de *Azolla* ocupaba un área superior a 0,5 m<sup>2</sup>, se midió la biomasa presente.

Las muestras recolectadas fueron colocadas en recipientes plásticos (315 cm<sup>2</sup> de superficie y 4 cm de profundidad) y trasladadas al laboratorio de Biología de Suelos del Ceniap-INIA. Todas las accesiones recolectadas se hicieron crecer en una solución suelo agua de 1:1 enriquecida con superfosfato triple a una concentración de 0,8 mg.kg<sup>-1</sup>. En estas condiciones, las recolectas fueron mantenidas en umbráculo a temperaturas

que oscilaron entre 28 a 38°C, y una humedad relativa de 80%. Cada dos días se le adicionó agua de chorro. El suelo fue cambiado cada 6 meses, manteniéndose en cada caso el mismo tipo de suelo de procedencia. El P fue adicionado cuando la concentración en la solución fue menor de 0,6 mg.kg<sup>-1</sup> (31).

El material recolectado de *Azolla*, se identificó a nivel de especie sólo en las muestras fértiles que presentaron mega y microesporocarpo, ya que los caracteres vegetativos no son suficientes para su clasificación a nivel de especie. Los caracteres vegetativos utilizados fueron principalmente la forma del cuerpo de la planta, se consideró el tallo principal, ramas laterales, número de pares de hojas por rama, forma y dimensión de la hoja dorsal y ventral (Tan *et al.*, (26)). Además, se estudio la anatomía y morfología de los órganos reproductivos presentes siguiendo la metodología de Svenson (24) y Tan *et al.* (26). Se estudiaron características del mega y microesporocarpo utilizando microscopio compuesto y electrónico, número de órganos flotadores, esporangios por microesporocarpo, másulas por esporangio, estructura de las másulas, así como presencia o no de septos sobre el gloquidio (26).

Para la determinación de la tasa de fijación de nitrógeno (TFN), tasa relativa de crecimiento (TRC) y tiempo de duplicación de la biomasa (TD), se sembraron 0.5 g de *Azolla* fresca, previamente identificada, en recipientes plásticos (95 cm<sup>2</sup> de área y 7 cm de profundidad). Se adicionó 250 ml de solución nutritiva de Hoagland (sin

nitrógeno) y el pH de la solución fue ajustado a 6,5 con 0,1M NaOH. Luego, fueron colocadas en el invernadero en las condiciones ambientales anteriormente mencionadas. La cosecha se realizó a los 15 días de la siembra.

Los tratamientos fueron arreglados en un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones. La solución nutritiva fue renovada cada 3 días. Luego de cosechadas, las muestras fueron secadas en una estufa a 90°C hasta alcanzar peso constante y por diferencia de peso se determinó el contenido de humedad de la muestra. La TRC y TD, fueron calculados usando las formulas propuestas por Lales *et al.* (10):

$$TRC = \frac{\ln p_2 - \ln p_1}{t}$$

$$TD = \frac{\ln 2t}{\ln \left( \frac{p_2}{p_1} \right)}$$

donde,  $p_1$  y  $p_2$  correspondieron al peso seco inicial y final, respectivamente, y  $t$  al periodo de observaciones en días.

Por otra parte, TFN fue establecida luego de la determinación del N total en la planta. La TFN fue calculada usando N total determinado al final de la incubación y dividido por el tiempo de incubación (t) en días (5).

Para la evaluación de la potencialidad de uso del P de las especies de *Azolla* nativas, sólo se consideraron aquellas accesiones que pudieron ser identificadas a nivel de especie. Se sembró 0,5 g de material fresco en

recipientes plásticos de 0,95 cm<sup>2</sup> de área, al cual se le adicionó solución nutritiva de Hoagland libre de nitrógeno y con concentraciones de P de 0, 0,5, 2, 4, 8 y 16 mg.L<sup>-1</sup>. La concentración de P en el medio fue determinada como la solución de P requerida para producir 95% de la pronosticada máxima producción de materia seca (25). Se utilizaron curvas respuestas para cada una de las accesiones evaluadas. La cosecha de las muestras fue realizada a los quince días después de la siembra. Los tratamientos fueron arreglados en un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones. La concentración de P en el tejido fue determinada por el método amarillo de vanadatomolibdato (9), después de una digestión húmeda con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (27).

El P total acumulado fue calculado con la materia seca total por la concentración de P en el tejido (8). La eficiencia de utilización de P fue calculada como materia seca total dividida por el P total acumulado (7).

Los datos fueron analizados con procedimientos provistos por el Sistema de análisis estadísticos (SAS) (22). Se utilizó el procedimiento Proc Mixed para el análisis de varianza y separación de medias. Todos los resultados fueron considerados significativamente diferentes a P<0,05, al menos que se indicara lo contrario. Por otra parte, los resultados obtenidos en los ensayos de invernadero fueron analizados por medio de un análisis de clasificación. Los agrupamientos fueron obtenidos por el método de distancia promedio (19).

## Resultados y discusión

### Descripción de los lugares de recolección

Durante el periodo muestreado se recolectaron un total de 67 muestras. El 50% de las accesiones fueron recolectadas en los estados Apure, Guárico y Portuguesa (cuadro 1), lo que podría explicarse por el mayor desarrollo de infraestructuras de riego y drenaje y/o persistencia de aguas superficiales en estos estados; además, de las altas aplicaciones de fertilizantes fosforados utilizados, lo cual, permite un desarrollo continuo de las especies de *Azolla* y por lo tanto, una mayor frecuencia de recolecta.

En general, la mayoría de las recolectas (70%) fueron realizadas en lagunas y canales de agua hechos por

el hombre con fines agrícolas. Sólo el 10% se localizaban en condiciones ambientales no asociadas a agroecosistemas. La profundidad del agua de los sitios de muestreo varió desde 5,0 hasta 90,0 cm, encontrándose la mayor proporción de las muestras en cuerpos de aguas con profundidades entre 32 a 50 cm.

Las características químicas del suelo y agua donde se recolectaron las accesiones de *Azolla* son presentadas en el cuadro 2. En general, se observó que las características evaluadas tanto en suelo como en el agua presentaron altos coeficientes de variación >16 y >103 para suelo y agua, respectivamente. Esto reflejó la diversidad de ambientes donde se puede desarrollar

**Cuadro 1. Distribución geográfica, año de recolecta, identificación de accesiones y de productividad de especies de *Azolla* nativas de Venezuela. Las recolectas fueron realizadas durante los meses de mayo a octubre de los años 1991 a 1993.**

Entidad Federal	Año de recolecta	Especie		Productividad		
		<i>Azolla filiculoides</i>	<i>Azolla microphylla</i>	<i>Azolla</i> n.i	Biomasa -----kg.ha <sup>-1</sup> -----	Nitrógeno
Apure	1992	6	0	10	583	17
Aragua	1991	1	1	0	815	31
Barinas	1992	2	0	3	952	29
Cojedes	1992	2	0	2	485	18
Delta Amacuro	1992	1	0	5	306	11
Guarico	1992	1	2	8	640	18
Lara	1992	0	0	1	1272	37
Mérida	1993	0	3	5	257	13
Monagas	1993	0	0	2	n.d.	n.d.
Portuguesa	1992	9	0	1	1340	40
Zulia	1992	1	0	1	n.d.	n.d.

n.i. = no identificas

n.d. = no determinado

Cuadro 2. Características de los suelos y aguas donde se recolectaron las muestras de *Azolla*.

Característica	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Coefficiente de variación
Suelo					
pH	6,54	1,01	4,81	8,81	16
CE (mmhos.cm <sup>-1</sup> )	0,21	0,32	0,01	1,23	130
MO (%)	2,42	1,62	0,23	5,64	70
P(mg.kg <sup>-1</sup> )	26,41	21,40	5,01	107,00	81
K (mg.kg <sup>-1</sup> )	147,34	106,40	24,02	488,00	72
Ca (mg.kg <sup>-1</sup> )	747,30	359,61	115,01	1395,00	48
Agua					
pH	8,01	0,52	6,82	8,73	6
CE (mmhos.cm <sup>-1</sup> )	0,70	1,83	0,04	13,01	263
MO (%)	1,01	2,24	0,00	12,13	228
P(mg.L <sup>-1</sup> )	9,63	22,20	0,00	216,12	302
K (mg.L <sup>-1</sup> )	46,52	68,43	0,11	344,41	158
Mg (mg.L <sup>-1</sup> )	8,42	8,72	0,02	36,32	103
Zn (mg.L <sup>-1</sup> )	0,51	0,07	0,00	0,43	138
Cu (mg.L <sup>-1</sup> )	0,06	0,32	0,00	0,44	530
Fe (mg.L <sup>-1</sup> )	1,43	2,43	0,00	12,01	166
Mn (mg.L <sup>-1</sup> )	0,22	0,53	0,00	2,40	236

CE = Conductividad eléctrica

MO = Materia orgánica

este helecho. Esto fue coincidente con las observaciones realizadas por San Valentin *et al.* (21).

Los valores de pH del suelo variaron entre 6,6 a 8,7, coincidiendo con lo reportado por Lumpkin y Plucknett (11), quienes encontraron que el intervalo óptimo para el desarrollo del sistema biológico *Azolla-anabaena* se situó entre 4,5 a 8,0. Igualmente, este intervalo incluyó los valores reportados por Quintero y Ferrara-Cerrato (17) que variaron entre 5,0 y 5,5 para el crecimiento de *A. caroliniana*.

### Identificación de las accesiones de *Azolla*

La identificación de las recolectas de *Azolla* a nivel de especie se realizó utilizando las características de los órganos reproductivos. Esta caracterización fue posible solo en aquellas accesiones donde se observó la formación de órganos sexuales. Aunque *Azolla* crece bien en los invernaderos, tanques o acuarios, raramente fructifica bajo tales condiciones. Así mismo produce a veces microesporangios bajo condiciones de invernadero; sin embargo, los megaesporangios son comparativamente raros. En este estudio, sólo en el 44% de las recolectas se observó una serie de estados de desarrollo del micro- y megaesporangio.

Se conoce poco sobre los factores que inducen la formación de esporocarpos. Becking (1) reportó que en regiones templadas con altas temperaturas y alta intensidad de luz, seguida de bajas temperaturas se indujo la formación de esporocarpos. En regiones tropicales, se ha reportado que bajas temperaturas indujeron la formación de esporocarpos en *A. pinnata* (2).

Los estados de desarrollo de micro y megaesporocarpos fueron observados en las accesiones luego de permanecer en el umbráculo por aproximadamente un mes. El 35% de las accesiones que formaron esporocarpos pertenecieron a la especie *A. filiculoides* y 9% a *A. microphylla* (cuadro 1). Aun cuando el microesporocarpo fue considerado para la clasificación a nivel de especie, el megaesporocarpo fue la característica más decisiva para una adecuada identificación. De acuerdo a Svenson (1944), las características más valiosas para el diagnóstico del género fueron la presencia de septos en los tricomas del gloquidio sobre la másula y el tipo de superficie escultural sobre la megaespora. Sin embargo, se han encontrado especímenes donde los tricomas son septados y no septados, (23). En este estudio, se examinó la apariencia de la superficie de la megaespora con la ayuda de un microscopio electrónico. Las características del microesporocarpo se tomaron usando un microscopio compuesto.

Cuando la forma de la planta era circular o en forma de abanico con presencia de papilas limitadas a las hojas y algunas ramas, el megaesporocarpo con apariencia regularmente punteada de aspecto parecido a una pelota de golf, y los gloquidios con pocas septas (menos de tres) o ninguna, se clasificó la planta como *A. filiculoides*. Por el contrario, si el aspecto del órgano femenino era irregular, con apariencia de una pelota de tenis, gloquidios con muchas septas (más de tres), especialmente cerca de su terminación distal, fue clasificada como *A. microphylla* (26).

Por otra parte, un 10% de las accesiones recolectadas produjo microesporangios, pero no se observaron megaesporocarpos. En este caso, se clasificaron como dudosas y fueron reportadas en este estudio como no identificadas. El resto de las recolectas (47%) no presentaron esporocarpos.

### Productividad de accesiones

En cuanto a la productividad de las recolectas de *Azolla* medida *in situ*, sin limitaciones de agua, se ubicó entre 257 a 1340 kg.ha<sup>-1</sup> de materia seca y 13 a 40 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrógeno (cuadro 1). Según Braun y Nierzwicki-Bauer (3) *Azolla* requirió de agua en cantidades abundantes para mantener su integridad estructural y procesos fisiológicos. Sin embargo, existen otros factores que pueden afectar la productividad de la planta. Se ha establecido que bajo condiciones óptimas, *Azolla* puede doblar su producción de biomasa cada 2 a 3 días (30).

Aunque en este trabajo no se relacionó el efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa a nivel de campo, es conocido que en condiciones controladas de laboratorio la tasa de crecimiento de *A. mexicana*, *A. microphylla* y *A. pinnata* fue mayor a temperaturas superiores a los 30°C; sin embargo, *A. caroliniana* y *A. filiculoides* se desarrollaron mejor a temperaturas menores de 25°C (16, 30). También existen otros factores, tales como luz y turbulencia del agua, que pueden afectar la productividad de la planta, por lo que se hace difícil comparar los valores aquí encontrados con otros reportados en ambientes diferentes.

Talley *et al.* (25) encontraron una productividad de 1800 kg.ha<sup>-1</sup> de

materia seca y 58 kg.ha<sup>-1</sup> de N para *A. filiculoides* y *A. caroliniana* en condiciones óptimas de crecimiento. En estudios en campos de arroz realizados por Watanabe *et al.* (29) a través de cosechas repetidas se reportaron rendimientos diarios de 0,4 a 3,6 kg N.ha<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. En general, se han reportado en la literatura valores de N fijado que oscilaron entre 53 a 1000 kg.ha<sup>-1</sup> y de producción de materia seca entre 39 a 390 t.ha<sup>-1</sup> en cultivos con ciclos de 40 a 365 días (6).

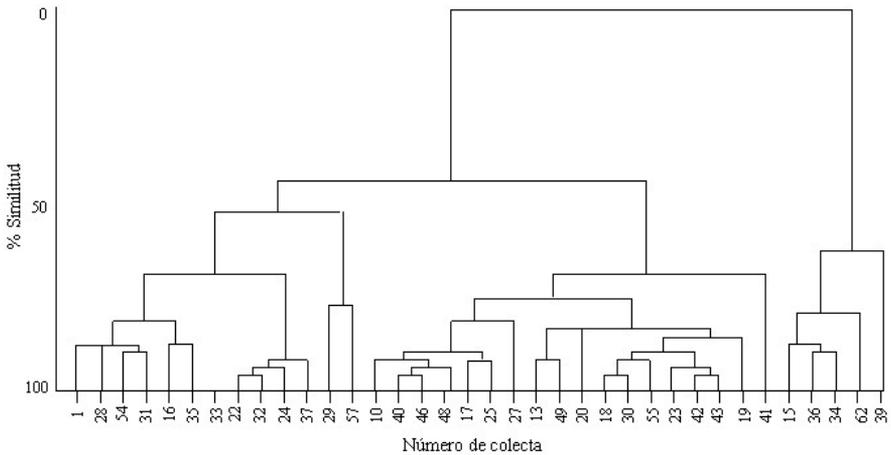
La TRC, el TD y la TFN de las recolectas mostraron diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) (cuadro 3). Las accesiones FONAIAP 16, 54 y 35 provenientes de los estados Guárico, Delta Amacuro y Portuguesa, respectivamente, mostraron el mayor potencial de mantener la TRC más alta (P<0,05) en condiciones óptimas de crecimiento, comparada con las otras recolectas; sin embargo, la mayor TFN fue observada en las recolectas FONAIAP 29 y 57 procedentes de los estados Portuguesa y Zulia, respectivamente. Con respecto al TD, la accesión FONAIAP 16 mostró el menor tiempo, necesario para duplicar su masa (2,90 d), mientras que la accesión FONAIAP 39 presentó el valor más alto (4,38 d).

Con la finalidad de comparar las accesiones en base a estas tres variables, se realizó un análisis de agrupamiento de las accesiones recolectas. Los grupos fueron asociados por el método de distancia promedio, lo que permitió la elaboración del dendograma el cual agrupó a las accesiones de acuerdo a su similitud (figura 2). Este análisis reveló tres gru-

**Cuadro 3. Tasa de fijación simbiótica de nitrógeno (TFN), tasa relativa de crecimiento (TRC) y tiempo de duplicación (TD) de especies de *Azolla*, colectadas en Venezuela.**

Nº de colecta <sup>1</sup>	Estado de procedencia	TFN (mg N g día)	TRC (g g día)	TD (días)	Potencialidad
FONAIAP 1	Aragua	12,3	0,23	3,02	Alto
FONAIAP 10	Guarico	11,2	0,22	3,20	Medio
FONAIAP 13	Guarico	10,8	0,21	3,45	Medio
FONAIAP 15	Guarico	9,5	0,22	3,24	Medio
FONAIAP 16	Guarico	12,6	0,24	2,90	Alto
FONAIAP 17	Guarico	11,2	0,23	2,98	Medio
FONAIAP 18	Apure	10,9	0,23	3,22	Medio
FONAIAP 19	Apure	10,7	0,22	3,09	Medio
FONAIAP 20	Apure	10,5	0,22	3,22	Medio
FONAIAP 22	Apure	11,8	0,23	3,09	Alto
FONAIAP 23	Apure	11,0	0,22	3,13	Medio
FONAIAP 24	Apure	11,9	0,23	3,09	Alto
FONAIAP 25	Apure	11,1	0,23	2,97	Medio
FONAIAP 27	Portuguesa	11,5	0,21	3,29	Bajo
FONAIAP 28	Portuguesa	12,4	0,23	3,11	Medio
FONAIAP 29	Portuguesa	13,8	0,23	2,96	Alto
FONAIAP 30	Portuguesa	10,9	0,22	3,21	Medio
FONAIAP 31	Portuguesa	12,4	0,23	2,99	Medio
FONAIAP 32	Portuguesa	11,8	0,22	3,08	Medio
FONAIAP 33	Portuguesa	12,7	0,21	3,24	Bajo
FONAIAP 34	Portuguesa	ND <sup>2</sup>	0,20	3,41	Medio
FONAIAP 35	Portuguesa	12,8	0,24	2,94	Medio
FONAIAP 36	Portuguesa	9,3	0,21	3,24	Bajo
FONAIAP 37	Portuguesa	11,7	0,23	3,05	Medio
FONAIAP 39	Portuguesa	ND	0,16	4,38	Bajo
FONAIAP 40	Portuguesa	11,3	0,23	3,14	Medio
FONAIAP 41	Portuguesa	10,2	0,23	3,03	Medio
FONAIAP 42	Barinas	10,2	0,23	3,10	Medio
FONAIAP 43	Barinas	10,9	0,23	3,04	Medio
FONAIAP 46	Barinas	11,3	0,22	3,16	Medio
FONAIAP 48	Aragua	11,3	0,23	3,05	Medio
FONAIAP 49	Cojedes	10,7	0,21	3,29	Bajo
FONAIAP 54	Delta Amacuro	12,5	0,24	2,97	Alto
FONAIAP 55	Delta Amacuro	10,8	0,22	3,19	Medio
FONAIAP 57	Zulia	13,3	0,23	3,04	Alto
FONAIAP 62	Mérida	8,9	0,21	3,35	Bajo
LSD (P<0.05)		0,52	0,011	0,189	

<sup>1</sup>El número de recolecta corresponde al orden de entrada de cada muestra al banco de germoplasma.<sup>2</sup>ND = no determinado.



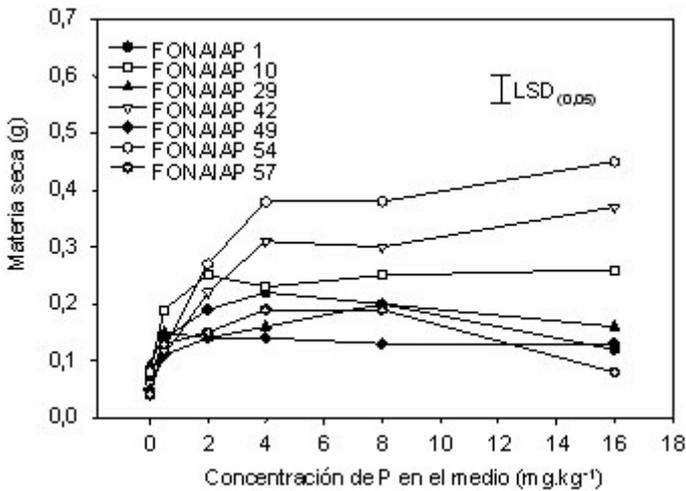
**Figura 2. Análisis de agrupamiento de 37 muestras de *Azolla* recolectadas en Venezuela. Los grupos fueron definidos teniendo 60% de similitud.**

pos con un coeficiente de similitud de 0,6, caracterizados por potencialidad alta, media y baja, respectivamente. El grupo más numeroso fue representado por una potencialidad media.

Estos resultados permitieron visualizar la variación existente entre las recolectas nativas de *Azolla*, lo cual produjo diferencias en su utilización como biofertilizante o suplemento proteínico para la alimentación animal. De acuerdo a esta clasificación, las accesiones con mayor TFN, TRC y menor TD fueron FONAIAP 1, 16, 22, 24, 31, 54 y 57 provenientes de Aragua, Guarico, Apure, Portuguesa, Delta Amacuro y Zulia, respectivamente. Estas accesiones presentaron un alto potencial para fijación de nitrógeno atmosférico, además de duplicar su biomasa en corto tiempo cuando no hubo limitaciones externas para su crecimiento, por lo que podrían recomendar como biofertilizante

o alimento animal; sin embargo, es necesario realizar estudios donde el factor suelo se incluya, ya que la interacción suelo-agua-planta puede modificar los resultados obtenidos en condiciones óptimas.

Por otro lado, uno de los factores que más limita el crecimiento de *Azolla* es la disponibilidad de P en el medio (17, 18). Para la ejecución de este ensayo se consideraron solo 7 de recolectas, estas accesiones previamente habían sido caracterizadas con potencialidad de TFN de alta, media o baja. La figura 3 resume la respuesta de producción de materia seca con respecto a la concentración de P en el medio de crecimiento. En general, aunque la materia seca incrementó con el aporte de P hasta 4 mg.L<sup>-1</sup>, este incremento fue significativo (P<0,05) solo para las recolectas FONAIAP 1, 10, 42, y 54. Cuando la concentración de P en solución fue de 0,5 mg L<sup>-1</sup> solo



**Figura 3. Curvas respuestas de materia seca para accesiones de *Azolla* nativas de Venezuela sobre limitadas concentraciones de P en solución.**

la accesión FONAIAP 10 tuvo una significativa ( $P < 0,05$ ) producción de materia seca ( $0,19 \text{ g.d}^{-1}$ ), comparada con el resto de las recolectas (aproximadamente  $0,13 \text{ g.d}^{-1}$ ). De acuerdo a Peters *et al.* (16) la máxima producción de materia seca de *Azolla* se ubica entre  $0,29\text{-}0,41 \text{ g.d}^{-1}$ , en este ensayo los requerimientos externos de P para producir 95% de la máxima producción de la materia seca fue de 2 y 4  $\text{mg.L}^{-1}$  para las accesiones FONAIAP 10, 54 y FONAIAP 42, respectivamente (figura 3).

La concentración de P en el tejido se incrementó con el aumento de la concentración de P del medio (figura 4). Cuando la concentración de P en el medio fue de  $8 \text{ mg.L}^{-1}$ , la concentración de P en el tejido alcanzó un valor máximo de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ . La accesión FONAIAP 54 identificada como *Azolla filiculoides*, procedente de Delta Amacuro, mostró una concentra-

ción de P en el tejido significativamente alta ( $P < 0,05$ ) comparada con el resto de recolectas a concentraciones de P del medio de  $>4$  ppm. Sin embargo, a concentraciones entre 2 y 4 ppm, todas las accesiones de *Azolla* alcanzaron productividad (figura 3). Este comportamiento refleja la existencia del denominado consumo de lujo de las plantas de *Azolla*. Resultados similares han sido encontrados por Watanabe *et al.* (29) para *A. pinnata*.

En general, la eficiencia de utilización de P declinó con el incremento de la concentración de P en el medio, indicando una disminución en la utilización interna de P para producir materia seca (figura 5). La eficiencia calculada de P para las accesiones estudiadas fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) sólo a bajas concentraciones de P en el medio (0 y  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Estos resultados fueron indicativos

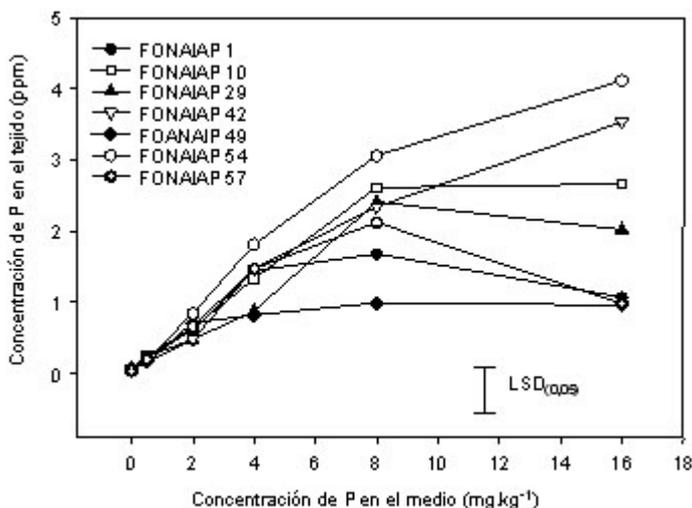


Figura 4. Efecto de la concentración de P en el medio sobre la concentración de P en el tejido de recolectas de *Azollas* nativas de Venezuela.

que las accesiones FONAIAP 10, 29 y 54 procedentes de Guárico, Portuguesa y Delta Amacuro, respectivamente,

fueron capaces de producir altas cantidades de materia seca con muy baja utilización de P interno.

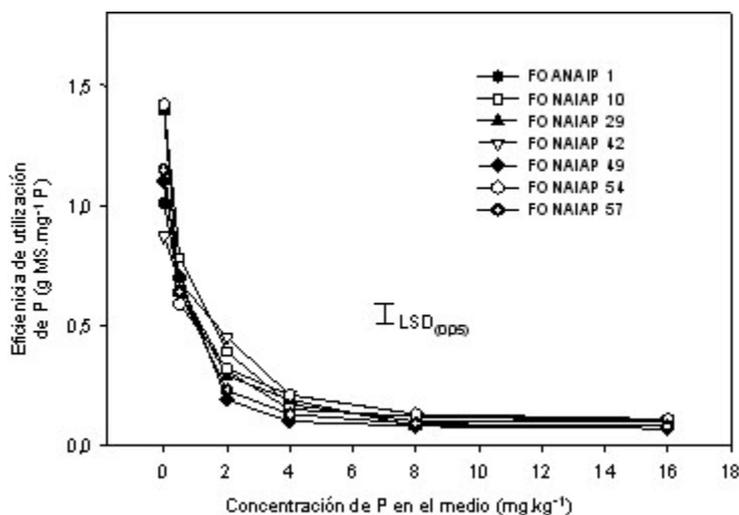


Figura 5. Relación de eficiencia de utilización de P de accesiones de *Azollas* nativas de Venezuela sobre un intervalo de concentraciones de fósforo.

Las medidas de eficiencia de nutriente (productividad por unidad de P disponible) sugieren que a muy bajas concentraciones de P (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), la aceción FONAIAP 10 perteneciente a la especie *A. microphylla* fue la más eficiente en el uso del P. Por otra parte, los requerimientos de P externos indicaron que la aceción

FONAIAP 10 requirió menos P en el medio para lograr el 70% de su máxima productividad (0,29 g MS), comparada con la aceción FONAIAP 54 perteneciente a la especie *A. filiculoides* que produjo el 70% de su productividad máxima (0,39 g MS) a concentraciones de P tres veces mayor.

## Conclusiones

En las expediciones realizadas en Venezuela se colectaron 67 aceciones de *Azolla*, de las cuales 29 se identificaron a nivel de especie. El resto no pudo ser identificado por la ausencia del megasporocarpos.

Aunque las aceciones FONAIAP 1, 16, 22, 24, 31, 54 y 57 fueron clasificadas con potencialidad alta para ser utilizadas como biofertilizante nitrogenado, por su alta TFN, TRC y un bajo TD, estas no fueron las más eficientes en la utilización de P; mientras que la aceción FONAIAP 10 clasificada con potencialidad media fue la más eficiente en

el uso del P.

Se encontró una gran variabilidad de respuestas al P dentro de las aceciones de *Azolla*, lo cual debe ser considerado como criterio de selección de dichas colectas cuando su utilización esté dirigida hacia suelos con limitaciones en la disponibilidad de P.

Es necesario realizar otras evaluaciones de las aceciones más promisorias encontradas en este estudio, donde el factor suelo sea incluido, ya que la interacción suelo-agua-planta puede modificar los resultados obtenidos bajo condiciones óptimas.

## Agradecimiento

Los autores quieren manifestar su agradecimiento al FONACIT por

el financiamiento de esta investigación, bajo el Proyecto N° S1-2311.

## Literatura citada

1. Becking, J. 1986. Nitrogen fixation by the *Azolla-Anabaena* symbiosis. p 53-61. *En: Proceeding of International Atomic Energy Agency. The role of isotopes in studies on nitrogen fixation and nitrogen cycling by blue-green algae and the Azolla-Anabaena azollae* association. IAEA, TECDOC 325. Vienna, Austria.
2. Boonkerd, N., P. Sawatdee y S. Choonluchanon. 1987. Methods to culture maintain, and propagate *Azolla* under tropical conditions. National Academy of Sciences, CRG, Thailand. p 7.
3. Braun, H., y S. Nierzwicki-Bauer. 1990. *Azolla-anabaena Symbiosis: Biochemistry, Physiology,*

- Ultrastructure, and Molecular Biology. p 40-50. *En*: CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria. Florida, USA.
4. Bremner, J.M. y C.S. Mulvaney. 1982. Nitrogen-total. p 595-624. *En*: A.L. Page (Ed). Method of soil analysis, 2<sup>nd</sup> ed. Agronomy No. 9. American Society of Agronomy, Madison, WI.
  5. Espinoza, Y. y R. Gutierrez. 2003. Variabilidad intraespecifica de *Azolla filiculoides*, colectadas en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 20:156-167.
  6. Ferentinos, L., J. Smith y H. Valenzuela. 2002. *Azolla*. 3 p. *En*: Sustainable agriculture green manure crops. Cooperative Extension Service. University of Hawaii. SA-GM-2.
  7. Gerloff, G.C. y W.H. Gabelman. 1983. Genetic basis inorganic plant nutrition. p 453-480. *En*: A Lauchli and R.L. Bielecki. (Eds). Encyclopedia of plant physiology. Vol. 15B. Springer Verlag, New York.
  8. Gourley, C.J. P., D.L. Allan y M.P. Russelle. 1994. Plant nutrient efficiency: a comparison of definitions and suggested improvement. *Plant and Soil* 158:29-37.
  9. Jackson, M.L. 1958. Soil Chemical Analysis. Prentice-Henglewood Cliffs. pp 162-165.
  10. Lales, J.S., R.S. Marte y M.A. Lapitan. 1986. Response of *Azolla* to some herbicides. *Phil.Agric.* 69:453-458.
  11. Lumpkin, T.A. y D.L. Plucknett. 1980. *Azolla*: Botany, physiology and use as a green manure. *Econ. Bot.* 34, 111-153
  12. Mehlich, A. 1984. Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Comm. Soil Sci. . Plant Anal.* 15:1409-1416.
  13. Moore, A.W. 1969. *Azolla*: biology and agronomic significance. *Bot. Rev.* 35:17-34.
  14. Olsen, S.R. 1953. Inorganic phosphorus in alkaline and calcareous soils. *Agronomy* 4:89-122.
  15. Ortega, F. 1980. Helechos acuáticos de Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. p 5-8.
  16. Peters, G.A., B.C., Mayne, T.B. Ray y R.A. Toia. 1979. Physiology and biochemistry of the *Azolla-anabaena* symbiosis. p 325-344. *En*: International Rice Research Institute (Ed.). Nitrogen and Rice. Los Baños, Philippines.
  17. Quintero, L.R. y R.F. Ferrara-Cerrato 1988. La simbiosis *Anabaena azollae*-*Azolla caroliniana* y la fijación de nitrógeno bajo el efecto de diferentes pH's. II Congreso Nacional de fijación biológica del nitrógeno. Guadajara, México. p 18-19.
  18. Quintero, L.R. y R.F. Ferrara-Cerrato. 2000. *Azolla* Helecho fijador de nitrógeno y su Potencial en México. p 41-51. *En*: J.J. Peña Cabriales (Ed.). La Fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas. Programa Arcal. Irapuato, México.
  19. Rencher, A. 1995. Methods of multivariate analysis. John Wiley & Sons, INC. USA. p. 326-348
  20. Reynaud, P.A. 1985. Growth and nitrogen fixation of *Azolla pinnata*. Environment condition and field plot inoculation assays. p 119-128. *En*: The role of isotopes in studies on nitrogen fixation and nitrogen cycling by blue-green algae and the *Azolla-Anabaena azollae* association. International Atomic Agency Procc. TECDOC 325. Vienna, Austria.
  21. San Valentin, G.O., E.M. Del Castillo y R.G Bayot. 1986. Effect of soil chemical properties on growth of *Azolla* in flooded soils. *Phil. Agric.* 69:521-527.
  22. SAS Institute, 2000. Procedures guide. Release 8.02 edition, Cary, NC.

23. Stolze R. 1983. Ferns and fern aliens of Guatemala. p 6-11 *In*: Fieldiana Botany No. 12.
24. Svenson, H.K. 1944. The new world species of *Azolla*. *Amer. Fern J.* 34:69-84.
25. Talley, S., B. Talley y D.W. Rains. 1977. Nitrogen fixation by *Azolla* in rice field. p 259-281. *En*: A. Hollaender (Ed.). Genetic engineering for nitrogen fixation. Plenum Press. New York.
26. Tan, B.C., P. Payawal, I. Watanabe, N. Lacdan y C. Ramírez. 1986. Modern taxonomy of *Azolla*; A review. *Phil. Agric.* 69:491-512.
27. Thomas, R.L., R.W. Sheard y J.R. Moyer. 1967. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digest. *Agronomy J.* 59:240-243.
28. Walkley, A. y I. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 34:29-38.
29. Watanabe, I., B. Ke-Zhi, N.S. Berja, C.R. Espinas, O. Ito y B.P. Subuchi 1981. The *Azolla-anabaena* complex and its use in rice culture. *IRRI* 69:1-11.
30. Watanabe, I. y N.S. Berja. 1983. The growth of four species of *Azolla* as affected by temperature. *Aquatic Botany* 15:175-185.
31. Watanabe, I., T. Lapis, R. Oliveros y W. Ventura. 1988. Improvement of phosphate fertilizer application to *Azolla*. *Soil Sci. and Plant Nutr.* 34:557-569.