

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

ESCUELA POLITÉCNICA DE MIERES

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS

AREA DE PRODUCCIÓN VEGETAL

AREA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL

TRABAJO FIN DE GRADO

**Evaluación de la respuesta en la producción de
biomasa del raigrás italiano al Fósforo**

AUTOR: Rubén Aguirre Muñiz

TUTOR: José Alberto Oliveira

COTUTOR: Elías Afif Khouri

ENERO, 2021

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	7
3. MATERIAL Y METODOS	10
3.1. Localización de la parcela de estudio	11
3.2. Toma de muestras de suelo en campo	12
3.3. Pretratamiento del suelo antes de la siembra	13
3.4. Pretratamiento de la muestra	14
3.5. Análisis de laboratorio	16
3.5.1. Preparación de las muestras	16
3.5.2. Determinación del P por colorimetría	20
4. RESULTADOS Y DISCUSION	22
4.1. Análisis edafológico	23
4.2. Datos meteorológicos	24
4.3. Producción de biomasa del raigrás italiano	25
4.4. Concentración y extracción de fósforo en hojas, tallos y biomasa	27
5. CONCLUSION	31
6. BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO I.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la parcela de estudio (Candás)	11
Figura 2. Clasificación órdenes del suelo(USDA)	12
Figura 3. Máquina empleada para triturar las muestras de hojas y tallos.....	15
Figura 4. Aspecto de la muestra al ser triturada	15
Figura 5. Horno de mufla	18
Figura 6. Calcinación de la muestra en los crisoles.....	18
Figura 7. Baño de arena.....	19
Figura 8. Muestras preparadas para introducirlas en el baño de arena.....	19
Figura 9. Tubos de ensayo preparados para introducir en el espectrofotómetro.....	20
Figura 10. Espectrofotómetro.....	21

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cinco niveles de dosis de P en la siembra	13
Tabla 2. Ejemplo Corte-Tratamiento-Peso	16
Tabla 3. Características fisicoquímicas del perfil del suelo en la finca Casero antes de la siembra del ensayo (septiembre 2019)	23
Tabla 4. Resumen climatológico (Temperatura y Precipitación) del año 2019-2020 procedente de la estación de Somió (Gijón) excepto la radiación solar que procede de un sensor de radiación solar colocado en la propia finca.	24
Tabla 6. Respuesta en kg MS/ha.año y altura del cultivar en el momento del corte de raigrás italiano Barmultra II a varias dosis de abonado fosfórico en Candás, Asturias, durante 2019-2020.....	25
Tabla 7. Producción de biomasa en hojas y tallos del raigrás italiano	27
Tabla 8. Respuesta en concentración de P (g P/kg sobre materia seca = sms) en hojas y tallos del cultivar de raigrás italiano Barmultra II a varias dosis de abonado fosfórico en Candás, Asturias, durante 2019-2020.....	28
Tabla 9. Respuesta en kg P/ha.año y eficiencia en la recuperación del P (%), del cultivar de raigrás italiano Barmultra II a varias dosis de abonado fosfórico en Candás, Asturias, durante 2019-2020.....	30

1. RESUMEN

El raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) es una especie gramínea forrajera que se caracteriza por su corta duración en el terreno y su gran apetencia para el ganado. Es una especie de fácil implantación, crecimiento rápido y de adaptación a gran variedad de suelos.

El fósforo (P) es un nutriente esencial para el crecimiento de los cultivos. Desempeña un papel importante en la fotosíntesis, en el transporte de nutrientes, en la síntesis y descomposición de glúcidos, síntesis de proteínas, actividad de las diastasas, y además actúa como transmisor de energía. Un adecuado suplemento de fósforo permitirá que estos procesos se desarrollen en condiciones óptimas y, que el crecimiento y reproducción de la planta procedan de manera correcta. Una deficiencia de fósforo podría reducir el crecimiento tanto de la hoja como de la raíz, lo que supondría generar una cantidad menor de biomasa.

Tratando de buscar la cantidad de fertilizante de fósforo (P) que se necesita para maximizar el rendimiento del forraje y el valor nutritivo del raigrás italiano de la zona, se realiza una analítica del forraje (tallos y hojas), para obtener datos que puedan ser relacionados con la cantidad de fósforo que extrajo la planta del suelo.

Se analizarán además los datos climatológicos en los que se desarrolló el cultivo y el estado edafológico en que se encuentra dicha parcela. Posteriormente estos datos serán relacionados con los datos de la analítica del forraje.

En este trabajo se ha involucrado la Universidad de Oviedo, la cual ha sido la encargada de, buscar las parcelas donde poder realizar el estudio, llevar a cabo la siembra y el control de la planta, y por último de realizar los cortes oportunos sobre el raigrás italiano. En concreto, la parcela donde se han cultivado este raigrás italiano se encuentra en Candás, dentro del concejo asturiano de Carreño. Se encuentra al Norte de la península ibérica, siendo uno de los puntos más septentrionales de ésta.

En la planificación sobre la fertilización del raigrás italiano, es necesario conocer su demanda de nutrientes para producir una determinada cantidad de forraje en un suelo y clima específico. Por ello, el objetivo de este trabajo se basa en obtener los datos más relevantes sobre el forraje de las plantas, mediante una analítica realizada en el laboratorio, en la que conoceremos diferentes variables para saber cuál es el estado de la planta como, la relación entre altura y kg de materia seca, los gramos de fosforo que

contienen tanto las hojas como el tallo, y demás datos que podremos sacar de las analíticas anteriormente mencionadas, con el fin de poder recomendar la dosis más adecuada de fósforo (P). Todos los datos serán recogidos en tablas que serán expuestas más adelante para poder analizar los resultados y sacar nuestras propias conclusiones.

2. INTRODUCCIÓN

La producción de forraje y las características de la vegetación son muy sensibles a las condiciones ambientales como la lluvia, la temperatura del aire y la radiación solar incidente (Taiz y Zeiger 2002). Los aspectos de la gestión de los pastos, como la cantidad de fertilizante aplicada (Woodard y Sollenberger 2011), y el manejo de la recolección con la frecuencia e intensidad de la defoliación (Pedreira *et al.*, 1999), juegan un papel importante en la morfología, composición química y producción de forraje.

Nuestro tipo de raigrás objeto del estudio será el raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam, *anual o alternativo y bianual o no alternativo*). El raigrás italiano es la gramínea pratense con mayor presencia en las explotaciones lecheras del Norte de España, tanto en monocultivo como en mezclas con otras especies. Flores-Calvete *et al.* (2017) indican que la frecuencia de explotaciones lecheras que cultivan raigrás italiano e inglés asciende, respectivamente, al 54,4% y el 48% para el conjunto de la zona Norte mientras que esta proporción en Galicia se incrementa hasta el 62,1% y el 55,7% respectivamente.

Según Flores *et al.* (2013), el cultivo en invierno de los raigrases italianos e híbridos es muy productivo y con un alto valor energético, aunque los niveles de proteína bruta pueden ser bajos en los cortes tardíos. Las variedades alternativas se prefieren para los cortes tempranos en primavera, mientras que las variedades no alternativas e híbridas son la mejor opción para los cortes realizados al principio del espigado. Se requiere más información sobre el comportamiento agronómico y el valor nutritivo de las diferentes variedades para diseñar las mejores estrategias de manejo de este cultivo.

Los modelos de simulación de cultivos pueden ayudar a decidir el mejor manejo agronómico para un determinado genotipo en un determinado ambiente. Esta interacción genotipo x ambiente x manejo es la base para la experimentación en programas de modelización de cultivos (McCauley, 2002).

El modelo CROPGRO-Perennial Forage (CROPGRO-PFM) es una versión modificada del modelo CROPGRO (Boote *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2003) incluido en el paquete informático del Sistema de Apoyo a las Decisiones para la Transferencia de Agrotecnología (DSSAT) (Hoogenboom *et al.*, 2019). Este sistema consiste en un conjunto de programas informáticos para simular el crecimiento de cultivos agrícolas. Se ha desarrollado para analizar opciones de manejo agrícola, estimar riesgos ambientales y

mejorar el uso de recursos mediante modelos de simulación de cultivos. Es un buen sistema de apoyo a la toma de decisiones.

A pesar de la importancia de los raigrases para la alimentación del ganado en todo el mundo, no se incluye en el DSSAT un modelo de simulación de crecimiento y desarrollo de éstos, por lo que Oliveira *et al.* (2020) realizaron una primera versión de trabajo de dicho modelo con el fin de simular el crecimiento y desarrollo de estas especies en Galicia.

Aunque el raigrás anual responde al fertilizante nitrogenado según Piñeiro y Pérez (1978), Oliveira *et al.* (2013) y Flores *et al.* (2013), esta respuesta puede estar limitada por el fósforo (P), como se ha demostrado en otros pastos (Malhi *et al.*, 2004; Schils y Snijders, 2004). Esto es particularmente cierto en los suelos con bajo contenido de P, como los que se dan en gran parte del norte de España (Tóth *et al.*, 2013). El CROPGRO-PFM no incluye un submodelo de P para el componente vegetal y, por lo tanto, el efecto de este nutriente no se considera en las simulaciones (se supone que el P no es limitante).

Como es costoso aplicar fertilizantes inorgánicos de P, es importante que se comprendan los factores que afectan a la disponibilidad de P de fuentes inorgánicas y orgánicas en diversos sistemas de cultivo y condiciones climáticas, de modo que los resultados puedan extrapolarse de una región a otra. El contenido total de P del suelo (formas inorgánicas y orgánicas) suele dividirse en diferentes grupos (soluble, lábil o intercambiable, insoluble) para facilitar la modelización del equilibrio del fósforo del suelo (Heng, 2000).

El objetivo de este estudio será la evaluación de la respuesta de la producción de biomasa al abonado fosfórico y con la información obtenida contribuir en el futuro a la creación de un submodelo P para el componente vegetal en el CROPGRO-PFM dentro del DSSAT.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Localización de la parcela de estudio

El ensayo se realizó en la finca “Casero” en Candás (43° 35' 03,95” N, 5° 46' 56,32” O, altitud 80 m, Asturias, España) en un clima templado marítimo. El área del estudio se incluye en la ecorregión Eurosiberiana, provincia Atlántica Europea del norte de España, subprovincia fitogeográfica Cántabro-Atlántica (Díaz González y Fernández Prieto, 1994).



Figura 1. Ubicación de la parcela de estudio (Candás)

La parcela en donde se implantó el ensayo estuvo destinada los últimos años a prado para la producción de forraje.

3.2. Toma de muestras de suelo en campo

Una vez se tiene una parcela de características específicas, la manera de proceder en la toma de muestras en el campo de estudio debe ser ejecutada de manera cuidadosa para obtener posteriormente unos análisis en los que se reflejen unos resultados representativos. Las muestras deberán ser tomadas en dos veces. Las fechas concretas de las cortas de la biomasa fueron las siguientes:

- Primer corte: 20-2-2020 (febrero), en estado vegetativo.
- Segundo corte: 23-4-2020 (abril), en estado inicio de espigado.

Antes de la siembra de nuestro ensayo, se realizó un estudio del perfil del suelo, determinando que el suelo pertenece al Orden Inceptisol (suelo pardo ácido cambisol diástrico) Suborden Udepts Grupo: Typic Dystrudepts (USDA-Soil Taxonomy, 1999).

La clasificación del USDA (United States Department of Agriculture) reconoce varios órdenes de suelos, cuyos nombres se forman anteponiendo una partícula descriptiva a la terminación **-sol**.

ORDEN	Características
ENTISOL	Casi nula diferenciación de horizontes; distinciones no climáticas: aluviones, suelos helados, desierto de arena...
VERTISOL	Suelos ricos en arcilla; generalmente en zonas subhúmedas a áridas, con hidratación y expansión en húmedo y agrietados cuando secos.
INCEPTISOL	Suelos con débil desarrollo de horizontes; suelos de tundra, suelos volcánicos recientes, zonas recientemente deglaciadas...
ARIDISOL	Suelos secos (climas áridos); sales, yeso o acumulaciones de carbonatos frecuentes.
MOLLISOL	Suelos de zonas de pradera en climas templados; horizonte superficial blando; rico en materia orgánica, espeso y oscuro.
ALFISOL	Suelos con horizonte B arcilloso enriquecido por iluviación; suelos jóvenes, comúnmente bajo bosques de hoja caediza.
SPODOSOL	Suelos forestales húmedos; frecuentemente bajo coníferas. con un horizonte B enriquecido en hierro y/o en materia orgánica y comúnmente un horizonte A gris-ceniza, lixiviado.
ULTISOL	Suelos de zonas húmedas templadas a tropicales sobre antiguas superficies intensamente meteorizadas; suelos enriquecidos en arcilla.
OXISOL	Suelos tropicales y subtropicales, intensamente meteorizados formándose recientemente horizontes lateríticos y suelos bauxíticos.
HISTOSOL	Suelos orgánicos. depósitos orgánicos: turba, lignito.... sin distinciones climáticas.

ACTIVIDADES AUXILIARES EN AGRICULTURA. MODULO 1

38

Figura 2. Clasificación órdenes del suelo(USDA)

Tal y como muestra la imagen, el orden INCEPTISOL, tiene las características de suelos con débil desarrollo de horizontes; suelos de tundra, suelos volcánicos recientes, zonas recientemente deglaciadas.

Estos análisis del suelo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Agroalimentario del Instituto de Nevares de Empresarios Agrarios (INEA, Valladolid) según métodos oficiales de análisis (MAPA, 1994).

3.3. Pretratamiento del suelo antes de la siembra

Las labores que se llevaron a cabo antes de la siembra de nuestro ensayo fueron las siguientes:

- Aplicación de herbicida total Roundup ultra plus (36% glifosato, sal potásica P/V, dosis 2 l/ha de producto comercial) el 28-9-19.
- El 10-10-19 pase de rotovator
- Aplicación de 2500 kg/ha de caliza (Agrocarb 100 de Asturiana de Calcitas con el 57% CaO) y de 200 kg/ha de K₂O en forma de sulfato potásico (52% K₂O).
- Pase de rotovator
- Aplicación de superfosfato de cal (18% P₂O₅ y 25% CaO) a las cinco dosis del ensayo.

Diseño: Bloques completos al azar con cuatro repeticiones y cinco niveles de P. Parcelas de 5 m x 2 m (10 m²).

Tabla 1. Cinco niveles de dosis de P en la siembra

Kg P ₂ O ₅ /ha	Kg P/ha
0	0
40	20
80	40
120	60
160	90

Pase de rotovator para enterrar el abono fosfórico.

Siembra de *Lolium multiflorum* bianual 4x Barmultra II a la dosis de 40 kg/ha el 29 de octubre de 2019. Pase manual de rastrillo para tapar la semilla.

Se aplicaron 140 kg N/ha/año, 70 kg N/ha un mes antes del primer corte, 70 kg N/ha después del primer corte.

Antes del corte de la biomasa en las parcelas se midió la altura en cuatro puntos de la parcela con un metro de carpintero. La altura en cada uno de los puntos fue la altura máxima del follaje en el punto de contacto con el metro de carpintero. Las parcelas se cosecharon cortando con una motosegadora con un peine de 1 m de ancho. La producción se determinó sobre una superficie de 4 m x 1 m (4 m²), centrada en los ejes de cada parcela, con el fin de evitar los efectos de borde que pudieran afectar a la producción. Las producciones de forraje se cortaron a una altura aproximada de 5 cm del suelo.

La producción de biomasa en cada parcela se pesó en el campo y una submuestra de 200 gramos en cada repetición y tratamiento se llevó al laboratorio de Producción Vegetal de la Universidad de Oviedo.

3.4. Pretratamiento de la muestra

Teniendo ya las muestras en el laboratorio, se llevó a cabo la separación de la muestra en hoja viva, tallo vivo (vainas + tallo) y material muerto. El peso seco total de las diferentes fracciones se determinó después de sacarlo en una estufa de aire forzado durante 48 horas.

La producción de materia seca en los diferentes componentes de cada muestra se calculó a partir de los pesos secos de las submuestras y posteriormente se estimó la producción de materia seca del total de la muestra.

Las muestras secas de hojas y tallos se molieron por separado y se hicieron pasar por un tamiz de 1 mm.



Figura 3. Máquina empleada para triturar las muestras de hojas y tallos

La materia seca, tanto los tallos como las hojas se introducirían por un pequeño agujero para que posteriormente fuesen trituradas. Debido a que algunas de las muestras eran excesivamente largas, se tuvieron que cortar con una tijera para que pudieran entrar de manera correcta dentro de la máquina.

El resultado de la muestra tras haber sido molida sería el siguiente:



Figura 4. Aspecto de la muestra al ser triturada

Esta muestra molida posteriormente se guardaría en unos sobres etiquetados correctamente con el nombre de cada tipo de tratamiento, y con el peso total de esta materia seca molida.

Una vez tenemos estos sobres preparados, podremos avanzar en el trabajo de laboratorio y empezar a trabajar sobre las muestras.

3.5. Análisis de laboratorio

3.5.1. Preparación de las muestras

Entre el primer y segundo corte, sumamos un total de 80 muestras, cada una señalada correctamente con el tipo de tratamiento y corte al que pertenece.

Tabla 2. Ejemplo Corte-Tratamiento-Peso

Tratamiento 1- Corte1	peso (gramos)
Peso del sobre	13,76
1--1 Hojas	23,78
1--1 Tallos	15,28
1--2 Hojas	24,58
1--2 Tallos	15,15
1--3 Hojas	24,36
1--3 Tallos	15,01
1--4 Hojas	22,71
1--4 Tallos	15,1
1--5 Hojas	24,45
1--5 Tallos	14,89

Esta tabla sería un ejemplo de cómo lo estructuramos en función del tipo de tratamiento.

La mineralización por vía seca será un procedimiento de preparación de las muestras, el cual constará de 2 fases.

La primera fase, será la fase de “calcinación”, en la que se pesan 0,5 gramos de materia seca y molida en un crisol de porcelana limpio y seco. Una vez tengamos las muestras preparadas, introducimos los crisoles en un horno de mufla durante 4 horas a una temperatura de 450 °C. Teniendo en cuenta que en este horno entran un total de 16 crisoles, este proceso nos llevará cierto tiempo (hasta alcanzar un total de 80 muestras).

Una vez pasadas estas 4 horas, dejaremos que las muestras se enfríen hasta temperatura ambiente para poder trabajar con ellas. Una vez las tengamos, ya podemos pasar a la segunda fase, denominada “digestión de las cenizas”.

En esta fase, se pasan las cenizas obtenidas a un vaso de precipitado de 50ml, y se humedecen con unas gotas de agua destilada. Se añade de 1 ml de HCl 6 N en el vaso de precipitado, y se repetirá el mismo proceso de añadir 1 ml de HCl 6N al crisol donde se realizó la calcinación, para poder recoger los restos que hayan podido quedar adheridos, y por último se vierte en el vaso de precipitado. Después, se lavará el crisol con 2 fracciones de unos 10 ml de agua destilada, que se añaden también al vaso de precipitado hasta llegar a unos 30 ml (el volumen total deberá ser inferior a 30 ml).

Una vez tengamos las muestras ya preparadas en los vasos de precipitado, las llevamos a una plancha (baño de arena) a 90 °C durante 30 minutos. Debemos tapar el vaso con un vidrio de reloj, y esperar a que esta muestra se enfríe una vez finalizado el proceso.

Cuando ya tenemos la muestra fría, se filtra sobre un matraz aforado de 50 ml y se lava el vaso varias veces con agua destilada, que se va añadiendo sobre el filtro hasta enrasar el matraz.

Hemos tenido problemas, debido a que el horario de la universidad era de 9:00 a 14:00, por lo que nos dejaba un margen de maniobra muy escaso. Entre que preparábamos la muestra para meterla en la mufla, y la espera tanto de las 4 horas como la de enfriar la muestra, nos ha llevado a que el proceso fuera muy lento.



Figura 5. Horno de mufla .



Figura 6. Calcinación de la muestra en los crisoles



Figura 7. Baño de arena

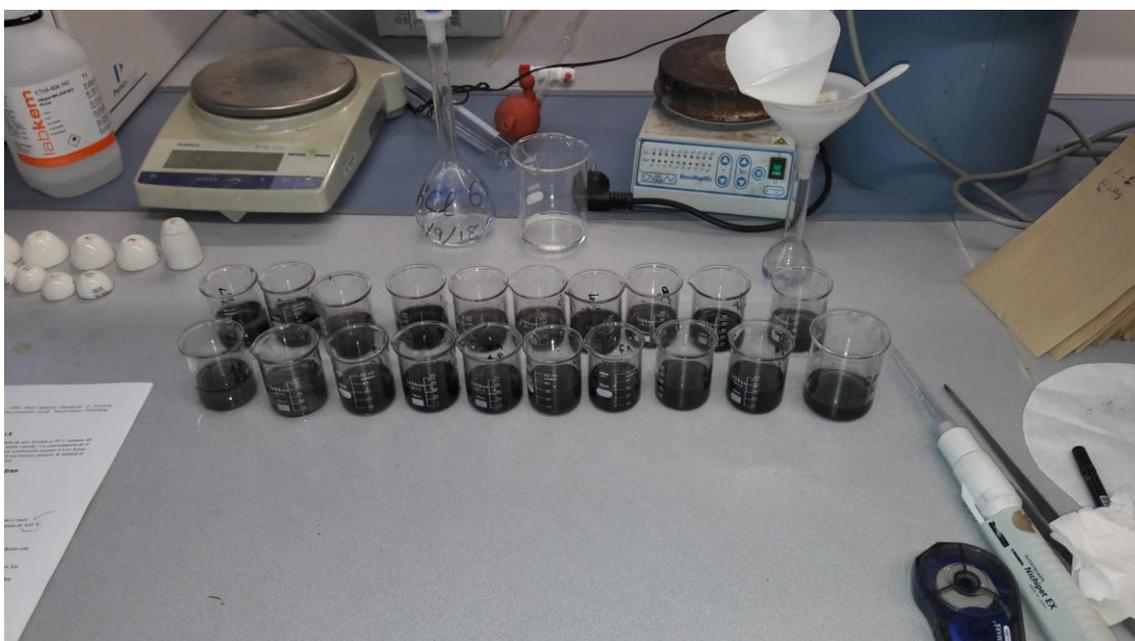


Figura 8. Muestras preparadas para introducirlas en el baño de arena

No trabajaremos sobre matraces aforados, sino sobre lecheritas, por tanto, trasladaremos todo el material líquido que tengamos en los matraces a lecheritas de plástico, las cuales son mucho más manejables.

3.5.2. Determinación del P por colorimetría

El fósforo tiene una importancia enorme en los procesos metabólicos como la fotosíntesis, transferencia de energía y, la síntesis y degradación de los carbohidratos. El fósforo se encuentra en el suelo en compuestos orgánicos e inorgánicos como los minerales.

En solución ácida y en presencia de iones V^{+5} Y Mo^{+6} , el fósforo forma un complejo estable fosfovanadomolibdico de color amarillo, cuya densidad óptica se mide en el colorímetro a una $\lambda = 430$ nm.

Para llevar a cabo la determinación del P, tendremos que preparar el reactivo nitrovanadomolibdico. Para la preparación de este reactivo, hemos tenido la ayuda del protocolo facilitado por la Universidad de Oviedo.

Una vez con este reactivo ya preparado, podremos añadir a cada tubo de ensayo 5 ml de la muestra de mineralizado foliar + 5 ml de reactivo nitrovanadomolibdico. Para conseguirlo, utilizamos una micropipeta para la toma de volúmenes, comprobando antes de cada medición que la precisión del aparato es la correcta.

Una vez obtenidos tubos de ensayo, estos se agitan manualmente y se dejan desarrollar el color durante 10 minutos, tras los cuales, se procede a la medición de los patrones en el espectrofotómetro a una $\lambda = 430$ nm.

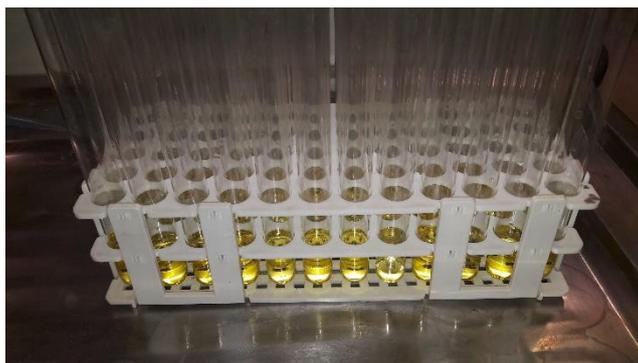


Figura 9. Tubos de ensayo preparados para introducir en el espectrofotómetro



Figura 10. Espectrofotómetro

La pendiente media del fósforo = 0,065

Para sacar la concentración del fósforo en material vegetal: (Absorbancia de la muestra/ pendiente media)*(200/1000). Una vez hecho estos cálculos en Excel,

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis edafológico

Los valores de pH son algo ácidos por lo que se estimó conveniente aplicar una enmienda caliza. Los valores de carbono orgánico son altos, debido a que, en los prados, el ritmo de descomposición de la materia orgánica es bajo debido a que no se realizan labores en el suelo.

Los niveles de P y K fueron bajos en los tres horizontes del suelo según MARM (2011). Los dos horizontes superiores suelos son franco-arenosos o franco arcilloso lo que influye en que el tiempo de infiltración del agua sea alto. En cambio, el horizonte C al ser arcilloso presenta una menor infiltración del agua

Tabla 3. Características fisicoquímicas del perfil del suelo en la finca Casero antes de la siembra del ensayo (septiembre 2019)

Variables	A (25 cm) Ocrico	Bw (25-40 cm) Cambico	C (40-60 cm) Argilico
pH (1:2,5)	5,3	5,4	5,4
Carbono orgánico (%)	3,71	1,80	1,39
Nitrógeno total (%)	0,32	0,15	0,12
Fósforo Olsen (ppm)	10	5	4
Potasio extraíble (ppm)	151	114	100
Limo (%)	29	24	18
Arena (%)	61	47	39
Arcilla (%)	10	29	43
Textura	Franco arenosa	Franco arcillo arenosa	Arcillosa
Densidad aparente (g/cm ³)	1,549	1,366	1,293
Agua punto marchitez (v/v)	0,090	0,166	0,237

Agua capacidad de campo (v/v)	0,203	0,281	0,353
Agua disponible (v/v)	0,113	0,115	0,116
Agua a saturación (v/v)	0,415	0,485	0,512
Infiltración (mm/h)	26,53	3,34	1,58

4.2. Datos meteorológicos

Tabla 4. Resumen climatológico (Temperatura y Precipitación) del año 2019-2020 procedente de la estación de Somió (Gijón) excepto la radiación solar que procede de un sensor de radiación solar colocado en la propia finca.

AÑO	MES	TEMPERATURA (°C)		PRECIPITACION	RADIACION SOLAR (MJ/m ² d)
		MAX	MIN	TOTAL	TOTAL
19	1	17,3	-1,4	174,8	4,48
19	2	21,2	0,8	35,1	9,59
19	3	25,1	2,7	35,8	13,78
19	4	25,6	4,8	101	15,86
19	5	25,3	5,1	67	21,14
19	6	26,7	7,8	77,2	16,13
19	7	26,2	12,1	33,6	18,05
19	8	29,8	11,6	28,2	15,9
19	9	28,3	10,4	40,4	13,64
19	10	24,3	6,2	190,4	8,6
19	11	25,1	3,1	348,6	4,29
19	12	19,7	-0,2	153,4	4,12
20	1	21	0,1	80,2	4,92
20	2	22,1	2,3	26,6	7,88
20	3	22,2	2,8	101,8	10,9
20	4	23,4	3,8	53,4	11,31
20	5	34,7	7,2	36	19,36
20	6	24,6	11,2	56	17,2
20	7	28,1	12,7	16	18,6
20	8	29,6	9,5	84,8	15,34
20	9	27,3	8,8	74	14,08

En la Península Ibérica (zona templada del planeta), al contar con una orografía variada, cuenta con 4 tipos de climas: clima Atlántico, clima Mediterráneo, clima de Montaña y clima Subtropical.

En Candás, al norte de la península, donde se encuentran nuestras parcelas de estudio, se tiene un clima Atlántico. La zona de estudio se encuentra en la zona costera de la cordillera cantábrica.

Tomando como referencia Candás, que es donde se encuentran nuestras parcelas, y observando la figura, obtenemos una temperatura que generalmente varía en función del mes en el que nos encontremos, siendo los meses más fríos de diciembre a abril.

4.3. Producción de biomasa del raigrás italiano

Tabla 5. Respuesta en kg MS/ha.año y altura del cultivar en el momento del corte de raigrás italiano *Barmultra II* a varias dosis de abonado fosfórico en Candás, Asturias, durante 2019-2020. Significación del efecto dosis de fósforo: *** $P < 0.001$. Diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P = 0,05$), $a > b > c$.

Fósforo (kg P/ha.año)	Altura (cm)		kg MS/ha		
	Corte 1 (20-2- 20)	Corte 2 (23-4- 20)	Corte 1 (20-2-20)	Corte 2 (23-4- 20)	Corte1+Corte2
0	30c	70c	1834c	5047c	6881d
20	35b	76bc	2149bc	5337bc	7486cd
40	38ab	79b	2387ab	5596b	7984bc
60	40a	81ab	2530a	5707ab	8238ab
80	42a	85a	2713a	6234a	8948a
Significación	***	***	***	***	***

Tanto la altura como la producción de biomasa en cada uno de los dos cortes como en la suma de los dos cortes resultaron significativamente diferentes (tratamiento dosis de

fósforo $P < 0,001$) aumentando los valores de acuerdo con el aumento de la dosis de abonado fosfórico.

En el primer corte (20-2-20) la producción de biomasa seca aérea del raigrás italiano se incrementó un 30% desde el control de P aplicado (0 kg P) al pico de respuesta a 40 kg P. La producción de biomasa con 40 kg P en el primer corte no se desvió significativamente respecto a la obtenida con los niveles de 60 y 80 kg P aplicado.

En el segundo corte (23-4-20) la producción de biomasa seca aérea del raigrás italiano se incrementó un 13% desde el control de P aplicado (0 kg P) al pico de respuesta a 60 kg P. La producción de biomasa con 60 kg P no se desvió significativamente respecto a la obtenida con los niveles de 80 kg P aplicado.

En la producción total de los dos cortes, la producción de biomasa seca aérea del raigrás italiano se incrementó un 20% desde el control de P aplicado (0 kg P) al pico de respuesta a 60 kg P. La producción de biomasa con 60 kg P no se desvió significativamente respecto a la obtenida con los niveles de 80 kg P aplicado. Este valor de 60 kg P/ha (120 kg P_2O_5 /ha) es similar a la dosis (110 kg P_2O_5 /ha) que recomienda Piñeiro *et al.* (2011) para cultivos forrajeros de invierno como el raigrás italiano en suelo con nivel bajo de fósforo y para una producción de materia seca total de 5000 kg MS/ha.

Investigaciones en suelos con bajos niveles de P (Robinson y Ellers, 1996) como los de este trabajo y con precipitaciones altas y temperaturas suaves mostraron resultados similares, indicando que las producciones más altas se alcanzaron con niveles de 40 kg P.

Tabla 6. Producción de biomasa en hojas y tallos del raigrás italiano

	Kg MS/ha	
	Corte 1 (20-2-20)	Corte 2 (23-4-20)
Hojas	1989	1525
Tallos	334	4060
Significación	***	***

En el corte 1 se observó una mayor producción de biomasa en forma de hojas, debido a realizarse el corte en un estado vegetativo. En cambio, en el segundo corte se obtuvo una mayor proporción de tallos en la biomasa debido a realizarse el corte al inicio del espigado, en correspondencia con lo que indican otros trabajos realizados sobre este tipo de cultivos forrajeros (Flores *et al.*, 2013).

4.4. Concentración y extracción de fósforo en hojas, tallos y biomasa

La concentración de fósforo en las hojas del raigrás se incrementó significativamente tanto en hojas como en tallos a medida que aumentó la dosis de P aplicado tanto en el corte 1 (estado vegetativo) como en el corte 2 (inicio de espigado).

En el corte 1 tanto en hojas como en tallos, la mayor concentración de P se obtuvo a la dosis de 80 kg P aplicado. En cambio, en el corte 2 tanto en hojas como en los tallos el pico de concentración se obtuvo con una dosis de 40 kg P aplicado, pues a partir de esta dosis no hubo diferencias significativas en la concentración de P.

En otros estudios (Hillard *et al.*, 1992; Robinson y Ellers, 1996) en los que no se hizo la separación entre hojas y tallos, el incremento en la dosis de fertilizante fosfórico aportado también incrementó la concentración de P en la biomasa del raigrás anual.

Tabla 7. Respuesta en concentración de P (g P/kg sobre materia seca = sms) en hojas y tallos del cultivar de raigrás italiano Barmultra II a varias dosis de abonado fosfórico en Candás, Asturias, durante 2019-2020. Significación del efecto dosis de fósforo: NS, no significativo, $P > 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. Diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P = 0,05$), $a > b > c$.

Fósforo (kg P/ha.año)	g P hojas/kg (sms)		g P tallos/kg (sms)	
	Corte 1 (20-2- 20)	Corte 2 (23-4-20)	Corte 1 (20-2- 20)	Corte 2 (23-4- 20)
0	1,5c	1,3c	1,6c	1,2c
20	2,0b	1,6b	1,9bc	1,4bc
40	2,1b	1,8ab	2,0b	1,5abc
60	2,2b	1,9ab	2,2b	1,6ab
80	2,9a	2,0a	2,9a	1,8a
Significación	***	***	***	**

Los rendimientos en fósforo en la biomasa fueron mayores cuando los rendimientos en biomasa fueron más altos, en particular en el corte 2.

Un aspecto importante en la fertilización de forrajes es la evaluación de la absorción y extracción de nutrientes en comparación con la dosis de fertilizante aplicado. Se entiende por absorción de nutrientes, la cantidad total de nutrientes absorbidos por el cultivo durante su ciclo de desarrollo. El término extracción es la cantidad total de nutrientes en los órganos cosechados, grano, forrajes u otros. En general los planes de fertilización se realizan teniendo en cuenta los niveles de extracción de los cultivos, buscando reponer los nutrientes que son absorbidos y depositados en los órganos cosechables, y que por lo tanto no son reciclados debido a que no vuelven al suelo (Ciampitti y García, 2007). En el caso de los forrajes cosechados, la biomasa aérea se extrae del terreno (ejemplo corte de forraje en verde, heno o ensilado) y la absorción y extracción de nutrientes es prácticamente similar (Butler *et al.*, 2006).

La eficiencia en la recuperación del P (incremento en la extracción de P por parte de la planta por unidad de nutriente aplicado) fue mayor (16%) con dosis bajas de abonado fosfórico (20 kg P aplicado), lo cual es común con dosis bajas de P aplicado en suelos con niveles bajos de P disponible (Butler *et al.*, 2008). Cuando un suelo con bajo nivel de fósforo disponible se fertiliza por primera vez, la eficiencia del fertilizante fosfórico es baja (a menudo <20%), debido a un proceso de “fijación” (McLaughlin *et al.*, 2011). A medida que se fertiliza con más P, la reacción de fijación se debilita, y se produce una reacción denominada desorción que implica una vuelta progresiva del P fijado a la solución del suelo, aumentando la eficiencia de las fertilizaciones con abonos fosfóricos (McLaughlin *et al.*, 2011).

La solubilidad de los iones ortofosfatos (monovalente y en menor proporción bivalente) que pueden ser asimilados por las plantas dependen fundamentalmente del pH y de la presencia de otros iones en la disolución del suelo (principalmente aluminio, calcio y hierro) (Hernández y Zamalvide, 1998; De Bussetti *et al.*, 1999; Cerón y Ancizar, 2012). En estos casos, los niveles de P del suelo se deberían incrementar con el tiempo. Esto no se determinó en este trabajo, estando, realizando en la actualidad los análisis del P disponible (método Olsen) del suelo para determinarlo.

Tabla 8. Respuesta en kg P/ha.año y eficiencia en la recuperación del P (%), del cultivar de raigrás italiano Barmultra II a varias dosis de abonado fosfórico en Candás, Asturias, durante 2019-2020. Significación del efecto dosis de fósforo: *** $P < 0.001$. Diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P = 0,05$), $a > b > c > d$.

Fósforo (kg P/ha.año)	kg P/ha			Eficiencia en la recuperación del P (%)
	Corte 1 (20-2- 20)	Corte 2 (23-4- 20)	Corte 1 + Corte 2	
0	2,9d	6,2c	9.1d	
20	4,2c	8bc	12.2c	16
40	5b	9b	14b	12
60	5,6b	9,7b	15.3b	10
80	7,7a	11,6a	19.3a	13
Significación	***	***	***	

5. CONCLUSIÓN

La cantidad óptima de P aplicado para la fertilización del raigrás italiano teniendo en cuenta la producción de biomasa seca total sería de 60 kg P/ha (=120 kg P₂O₅/ha)

A la dosis de 60 kg P/ha aplicado, la eficiencia de la recuperación del P (%) fue del 10%, lo que posiblemente incrementará el nivel de P en el suelo con el tiempo.

La mayor eficiencia en la recuperación del P (16%) se lograría con una dosis de 20 kg P/ha, pero del punto de vista agronómico la producción de biomasa seca sería menor que con una dosis de abonado de 60 kg P/ha.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, G. (1980). Assessing organic phosphorus in soils. In: F.E. Khasawneh et al. (Eds.) p. 411-431. The role of phosphorous in agriculture. ASA, Madison, WI.
- Boote, K.J., Jones, J.W., Hoogenboom, G., Pickering, N.B. (1998). The CROPGRO model for grain legumes. In: G.Y. Tsuji, G. Hoogenboom, and P.K. Thornton, eds. Understanding Options for Agricultural Production. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 99-128.
- Butler, T.J., Muir, J.P., Provin, T., Stewart, W.M. (2006). Phosphorus fertilization of annual ryegrass. *Better Crops*. Vol. 90 (3): 6-9
- Butler, T.J., Muir, J.P., Provin, T.L. (2007). Phosphorus fertilization of annual ryegrass and comparison of soil phosphorus extractants. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 9-20.
- Cerón, L.E. Ancizar, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1): 285-295.
- Ciampitti, I.A., García, F.O. (2008). Requerimientos nutricionales. Absorción y extracción de macronutrientes y nutrientes secundarios. II. Hortalizas, frutales y forrajeras. International Plant Nutrition Institute, Archivo Agronómico nº12: 1-4. <http://lacs.ipni.net/article/LACS1083>.
- De Bussetti, S.G., Ferreiro, E.A., Natale, I.M., Mandolesi, M.E. (1999). Fósforo retenido por suelos y por sus fracciones granulométricas en relación con la materia orgánica. *Ciencia del Suelo*, 17(2): 54-57.
- Díaz González, T.E., Fernández Prieto, J.A. (1994). El paisaje vegetal de Asturias. *Itinera Geobotanica* 8:5-242. Servicio de Publicaciones de la Universidad de León. León.
- Flores Calvete, G., Díaz, N., Valladares Alonso, J., Pereira Crespo, S., Fernández-Lorenzo, B., Resch Zafra, C., Piñeiro Andián, J. (2013). Evaluación de especies de raigrás

italiano e híbrido en cultivo de invierno para integrar rotaciones forrajeras de dos cultivos por año. *Afriga* N° 106: 90-102.

Flores, G., Díaz, N., Díaz, D., Valladares, J., Pereira-Crespo, S., Fernández-Lorenzo, B., Resch, C., Rodríguez-Diz, X., Piñeiro, J. (2013). Evaluación de cultivares de raigrás italiano e híbrido como cultivo de invierno para ensilar en primavera. *Pastos*, 43(1): 20-34.

Flores-Calvete, G., Martínez-Fernández, A., Doltra, J., García-Rodríguez, A., Eguinoa-Ancho, P. (2017). Informe estructura y sistema de alimentación de las explotaciones lecheras de Galicia, Cornisa Cantábrica y Navarra, 52 p.

Heng, L.K. (2000). Modelling, database and the P submodel. In *Management and Conservation of Tropical Acid Soils for Sustainable Crop Production*. IAEA TECDOC 1159, IAEA, 101-108. Vienna, Austria: IAEA.

Hernández, J., Zamalvide, J.P. (1998). Procesos de retención de fósforo por los suelos evaluados a través de parámetros de suelo y planta. *Agrociencia* (Montevideo). 2(1), 48-63.

Hillard, J.B., Haby, V.A., Hons, F.M. (1992). Annual ryegrass response to limestone and phosphorus on an ultisol. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* Vol. 23: 175-188.

Holford, I.C.R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Australian journal of soil research* 35:227-240.

Hoogenboom, G., Porter, C.H., Shelia, V., Boote, K.J., Singh, U., White, J.W., Hunt, L.A., Ogoshi, R., Lizaso, J.I., Koo, J., Asseng, S., Singels, A., Moreno, L.P., Jones. J.W. (2019). Decision Support System for Agrotechnology Transfer (DSSAT) Version 4.7.5 (<https://DSSAT.net>). DSSAT Foundation, Gainesville, Florida, USA.

Jones, J.W., Hoogenboom, G., Porter, C.H., Boote, K.J., Batchelor, W.D., Hunt, L.A., Wilkens, P.W., Singh, U., Gijsman, A.J., Ritchie, J.T. (2003). The DSSAT cropping system model. *Eur. J. Agron.*, 18: 235-265.

Malhi, S. S., Gill, K.S., McCartney, D.H., Malmgren, R. (2004). Fertilizer management of forage crops in the Canadian Great Plains. *Recent Research Developments Crop Science Research Signpost, Trivandrum* 1(1): 237-271.

MAPA. (1994). Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riego. En: *Métodos Oficiales de Análisis Vol III* (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Eds.).

MARM. (2011). Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid.

McCauley, D.J. (2020). Predictive agriculture. Crop modeling for the future. *CSA News Magazine*, 65 (5): 3-9.

McLaughlin, M.J., McBeath, T.M., Smernik, R., Stacey, S.P., Ajibove, B., Guppy, C., (2011). The chemical nature of P accumulation in agricultural soils; implications for fertiliser management and design: an Australian perspective. *Plant and Soil*, 349(1-2): 69-87.

Oliveira J.A., Afif-Khoury E., Palencia P., Gorgoso, J. (2013). Efecto del abonado nitrogenado sobre el primer corte de primavera en un cultivo invernal de raigrás italiano. En: Olea L. et al. (Eds.) *Los pastos: nuevos retos, nuevas oportunidades*, pp. 227-234. Badajoz, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

Oliveira J.A., Boote, K.J., López, J.E., Díaz, N., Piñeiro, J., Flores, G. (2020). Adaptación del modelo CROPGRO-Perennial-Forage para simular la producción de los raigrases. *Revista Vaca Pinta* nº 19: 140-155.

Pedreira C.G.S., Sollenberger L.E., Mislevy P. (1999). Productivity and nutritive

value of 'Florakirk' bermudagrass as affected by grazing management. *Agronomy Journal* 91: 796-801.

Piñeiro, J., Pérez, M. (1978). El nitrógeno en una mezcla de raigrás italiano y trébol violeta. *Pastos*, 8(2): 239-263.

Piñeiro, J., Castro, J., Blázquez, R., Lloveras, J. (2011). Abonado de los cultivos forrajeros. En: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Secretaria General Técnica. Centro de Publicaciones (Eds). Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Madrid.

Raven, K.P., Hossner, L.R. (1993). Phosphate desorption quantity-intensity relationships in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57:1505-1508.

Robinson, D.L., Ellers, T.L. (1996). Phosphorus and potassium influences on annual ryegrass production. *Louisiana Agriculture* 2: 10-11.

Saxton, K.E., Rawls, W.J., Romberger, J.S., Papendick, R.I. (1986). Estimating generalized soil water characteristics from texture. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 50(4): 1031-1036.

Schils, R., Snijders, P. (2004). The combined effect of fertilizer nitrogen and phosphorus on herbage yield and changes in soil nutrients of a grass/clover and grass-only sward. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 2: 165-179.

Taiz L, Zeiger E. (2002). *Plant physiology* (third edition). Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA. 690 pp.

Tóth, G., Jones, A., Montanarella, L. (2013). The LUCAS topsoil database and derived information on the regional variability of cropland topsoil properties in the European Union. *Environmental Monitoring and Assessment* 185 (9): 7409-7425.

USDA-Soil Taxonomy (1999). A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys, 869 p. Agriculture Handbook No. 436, 2nd Edn. Soil Survey Staff. Washington DC.

Woodard K.R, Sollenberger L.E. (2011). Broiler litter vs. ammonium nitrate as N source for bermudagrass hay production: yield, nutritive value, and nitrate leaching. *Crop Science* 51: 1342-1352.

ANEXO I

Protocolos y metodología llevada a cabo en los análisis en el laboratorio

Determinación del fósforo Mehlich 3

Disolución extractora Mehlich:

En un matraz aforado de 2 L colocar:

- 30 ml de amonio fluoruro NH_4F 1 M
- 20 ml de AEDT ácido etilendiaminotetraacético disodium $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M
- 26 ml de ácido nítrico HNO_3 1 M
- 40,025 g de nitrato de amonio NH_4NO_3
- 24,02 g de ácido acético $\text{CH}_3\text{-COOH}$

+ H_2O destilada hasta 2 L

Cálculo de molaridad

Molaridad: Es la forma más frecuente de expresar la concentración de las disoluciones en química. Indica el número de moles de soluto disueltos por cada litro de disolución; se representa por la letra *M*. Una disolución 1 M contendrá un mol de soluto por litro.

$$M = \frac{(x) \text{ g de soluto/P.M.}}{V \text{ de la disolución en litros}}$$

Preparación de amonio fluoruro NH_4F 1 M: en un matraz aforado de 100 ml pesar 3,704 g de amonio fluoruro y enrasar a 100 ml con agua destilada

Preparación de AEDT 0,1 M: en un matraz aforado de 100 ml pesar 2,922 g de AEDT y enrasar a 100 ml con agua destilada

Preparación de ácido nítrico HNO_3 1 M, teniendo en cuenta el porcentaje de pureza: en un matraz aforado de 100 ml tomar 9,7 ml de ácido nítrico y enrasar a 100 ml con agua destilada.

Otra forma para preparar la disolución extractora Mehlich:

En un matraz aforado de 2 L añadir y disolver poco a poco: 1,1 g de amonio fluoruro + 0,74 g de AEDT + 2,5 ml de ácido nítrico + 40 g de nitrato de amonio + 24 g de ácido acético + H₂O destilada hasta 2 L

Solución A:

En un matraz aforado de 250 ml, se disuelven 12,5 g de molibdato amónico (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en 100 ml de agua destilada aproximadamente, añadir 0,305 g de tartrato de antimonio y potasio C₈H₄K₂O₁₂Sb₂·3H₂O, añadir también en campana y lentamente 125 ml de ácido sulfúrico H₂SO₄ y se enrasa a 250 ml con agua destilada.

Solución de trabajo:

En un matraz aforado de 500 ml, se pesan 4,40 g de ácido ascórbico (vitamina C) C₆H₈O₆ y se disuelven en 200 ml de agua destilada aproximadamente, se añaden 50 ml de solución A y se enrasa a 500 ml con agua destilada.

Preparación de una disolución madre de 100 ppm de P:

Utilizamos fosfato de amonio monobásico NH₄H₂PO₄

ppm (elemento)=sal ((fuente en ppm (g/1000 l))×peso atómico del elemento/P.M.

En un matraz aforado de 1 L pesar 0,3714 g de fosfato de amonio monobásico y enrasar a 1000 ml con agua destilada.

Preparación de un patrón de P de 10 ppm:

Llevar 10 ml de la disolución madre anterior a un matraz aforado de 100 ml y enrasar con agua destilada.

Preparación del extracto:

- Pesar 2,5 g de suelo y colocarlo en una lecherita de 60 ml de capacidad
- Añadir 25 ml de disolución extractora Mehlich
- Agitar 5 min. y filtrar basando el sobrenadante a otra lecherita

Realización de la colorimetría:

En tubos de ensayo de 25 ml de capacidad:

- Blanco: colocar 5 ml de disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada. Hay que tener 2 blancos como mínimo
- Muestra: 2 ml del extracto de la muestra + 5 ml de disolución trabajo + 18 ml de agua destilada
- Patronos: diferentes concentraciones en ppm de fósforo:
 - Patrón 1:* 0,1 ml del patrón de 10 ppm P + 4,9 ml disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada
 - Patrón 2:* 0,25 ml del patrón de 10 ppm P + 4,75 ml disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada
 - Patrón 3:* 0,5 ml del patrón de 10 ppm P + 4,5 ml disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada
 - Patrón 4:* 1 ml del patrón de 10 ppm P + 4 ml disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada
 - Patrón 5:* 2 ml del patrón de 10 ppm P + 3 ml disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada

Patrón 6: 3 ml del patrón de 10 ppm P + 2 ml disolución extractora Mehlich + 5 ml de disolución trabajo + 15 ml de agua destilada

Se espera 2 horas (en nuestro caso 10 min.) para el desarrollo del color y se mide la absorbancia en el fotocolorímetro a 880 nm de longitud de onda.

Cálculo:

En primer lugar hay que determinar las concentraciones reales del P en los patrones preparados a medir (en los tubos de ensayo de 25 ml):

$$\text{Patrón 1} = 0,04 \mu \text{ P ml}^{-1}$$

$$\text{Patrón 2} = 0,1 \mu \text{ P ml}^{-1}$$

$$\text{Patrón 3} = 0,2 \mu \text{ P ml}^{-1}$$

$$\text{Patrón 4} = 0,4 \mu \text{ P ml}^{-1}$$

$$\text{Patrón 5} = 0,8 \mu \text{ P ml}^{-1}$$

$$\text{Patrón 6} = 1,2 \mu \text{ P ml}^{-1}$$

Determinar la recta de absorbancia en el fotocolorímetro. Para ello se anota la absorbancia (A) correspondiente a 880 nm de los diferentes patrones preparados. Así y teniendo en cuenta la concentración real del P en cada patrón ($\mu\text{g P ml}^{-1}$ o ppm de P) se realizará los siguientes cálculos:

Con. $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P	Absorbancia (A)	Pendiente (b)
0	0	
0,04	$A_{0,04}$	$b_{0,04}=A_{0,04}/0,04$
0,1	$A_{0,1}$	$b_{0,1}=A_{0,1}/0,1$
0,2	$A_{0,2}$	$b_{0,2}=A_{0,2}/0,2$
0,4	$A_{0,4}$	$b_{0,4}=A_{0,4}/0,4$
0,8	$A_{0,8}$	$b_{0,8}=A_{0,8}/0,8$
1,2	$A_{1,2}$	$b_{1,2}=A_{1,2}/1,2$

Cálculo de la b media: $\bar{b} = \frac{\sum b_i}{n}$ (siendo n el número de patrones).

Determinar la señal de absorbancia en la muestra (A_m) utilizando el fotocolorímetro. Si la señal A_m es mayor que el valor más alto de la curva de calibración, es decir ($A_m > A_{1,2}$) entonces debemos tomar una alícuota más pequeña de la muestra (del sobrenadante tras la filtración) para que la lectura del fotocolorímetro esté dentro del intervalo 0- $A_{1,2}$; o bien preparar otro patrón con una concentración real de P superior a $1,2 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Determinar la cantidad de P aprovechable por la planta en mg kg^{-1} o ppm:

$$P(\text{mgkg}^{-1}) = \frac{A_m / \bar{b}(\mu\text{gml}^{-1}) \frac{25\text{ml}}{2\text{ml}} 25\text{ml}}{2,5\text{g}}$$

Niveles críticos

$P < 20 \text{ mg kg}^{-1}$ probablemente exista respuesta al abonado con P

$20 \text{ mg kg}^{-1} < P < 40 \text{ mg kg}^{-1}$ la respuesta al abonado con P puede depender de otras propiedades del suelo y de la planta

$P > 40 \text{ mg kg}^{-1}$ probablemente no exista respuesta al abonado

JONES, JB.; WOLF, B. & MILL, HA.; 1991. *Plant Analysis Handbook: A Practical Sampling, Preparation, Analysis and Interpretation Guide*. Micro-Macro Publishing. Athens. GA

B, P, Ca, Mg y K

Las plantas se lavan con agua destilada, se secan en estufa de aire forzado a 70 C durante 48 H y se muelen hasta pasar por un tamiz de 0.5 mm de luz de malla circular. La concentración de P y B se determina mediante espectrofotometría visible previa combustión durante 4h en horno mufla a 450 °C y disolución de las cenizas con HCl 6N. En ese mismo extracto se analiza el Ca, Mg y K total mediante espectrometría de absorción atómica.

Preparación de las muestras

Reactivo

Preparación de HCl 6N

Mineralización por vía seca

El procedimiento de preparación de las muestras se divide en 2 fases:

A- Calcinación

- Se pesan 0,5g de materia seca y molida en un crisol de porcelana limpio y seco.
- Se introduce la muestra en un horno de mufa durante 4 h a una temperatura de 450 °C. Pasado este tiempo se deja enfriar la muestra hasta temperatura ambiente.

B- Digestión de las cenizas

- Se pasan las cenizas obtenidas a un vaso de precipitado de 50 ml, y se humedecen con unas gotas de agua destilada.
- Se añade 1 ml de HCl 6N en el vaso de precipitado.
- Se añade 1 ml de HCl de 6N al crisol donde se realizó la calcinación, para recoger los restos que hayan podido quedar adheridos, y se vierte en el vaso de precipitado.
- Se lava el crisol con 2 fracciones de unos 10 ml de agua destilada, que se añaden también al vaso de precipitado. El volumen total debe ser inferior a 30 ml.
- Se tapa el vaso con un vidrio de reloj y se coloca en una plancha (baño de arena) a 90 °C durante 30 minutos.
- Una vez la muestra fría se filtra sobre un matraz aforado de 50 ml.
- Se lava el vaso varias veces con agua, que se va añadiendo sobre el filtro hasta enrasar el matraz.

Nota: esta preparación sirve para determinar la concentración de todos los elementos menos el N.

Determinación del P por colorimetría

Fundamento

En solución ácida y en presencia de iones V^{+5} Y Mo^{+6} , el fósforo forma un complejo estable fosfovanadomolibdico de color amarilla, cuya densidad óptica se mide en el colorímetro a una $\lambda = 430$ nm.

Reactivos

- ❖ Preparación de la solución A \rightarrow (Molibdato amónico 10 %): se pesan 53,1 g de molibdato amónico $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4H_2O$, y se disuelven en 350 ml de agua destilada, los cuales se encuentran en un matraz aforado de 500 ml. Una vez disueltos, se añaden 10 ml de hidróxido amónico (NH_4OH) , enrasando a posteriori el matraz a su volumen final (500ml)

- ❖ Preparación de la solución B \rightarrow (Vanadato amónico 0,25 %): Se toman 700 ml de agua destilada en un matraz aforado de 1L, el cual se coloca sobre un agitador magnético con control de temperatura a 900 rpm, y 75 °C. Una vez caliente el agua, se adicionan lentamente 2,5 g de Vanadato amónico (NH_4VO_3) , teniendo en cuenta que es un reactivo que se disuelve con dificultad. Una vez disueltos se deja enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente, momento en el cual se adicionan 7 ml de ácido nítrico (HNO_3) .

- ❖ Preparación del reactivo nitrovanadomolibdico: La preparación de este reactivo, es necesario llevarla a cabo, el mismo día que se va a proceder al análisis de las muestras. Para ello se toma un matraz aforado de 100 ml y en él se adiciona las siguientes cantidades de los reactivos preparados con anterioridad: 20 ml de solución A + 20 ml de solución B + 19,4 ml de HNO_3 + agua destilada hasta enrasar el matraz.
El resultado final será la obtención de una mezcla de color pardo-amarillento, que es la que permite medir el color en el espectrofotómetro UV-Vis.

- ❖ Preparación de la solución patrón de P (1000 ppm): Se toman 0,439 g de KH_2PO_4 y se disuelven en agua destilada en el interior de un matraz aforado de 100 ml, procediéndose a continuación a enrasar el matraz a su volumen final.
- ❖ Preparación de la solución patrón de P (20ppm): Para su obtención se requiere un matraz aforado de 100 ml, y se parte de la solución patrón anterior de 1000 ppm, de la cual se toman 2ml. El resto de volumen que se lleva sobre el matraz hasta enrasar es agua destilada, pasando así de una concentración 1000 ppm a una concentración 20 ppm.

Realización de la colorimetría

Construcción de la curva de calibrado

Para la construcción de la curva de calibrado del P, se toman 6 tubos de ensayos perfectamente limpios y secos, los cuales se rotulan del siguiente modo:

- Patrón 0 (Blanco): 5 ml de agua destilada + 5 ml de reactivo nitrovanadomolíbico
- Patrón 1 (1ppm P): 4 ml de agua destilada + 1 ml de solución patrón de P (20 ppm) + 5 ml de reactivo nitrovanadomolíbico
- Patrón 2 (2 ppm P): 3 ml de agua destilada + 2 ml de solución de patrón de P (20 ppm) + 5 ml de reactivo nitrovanadomolíbico
- Patrón 3 (3 ppm P): 2 ml de agua destilada + 3 ml de solución de patrón de P (20 ppm) + 5 ml de reactivo nitrovanadomolíbico
- Patrón 4 (4 ppm P): 1 ml de agua destilada + 4 ml de solución de patrón de P (20 ppm) + 5 ml de reactivo nitrovanadomolíbico
- Patrón 5 (5 ppm P): 5 ml de agua destilada + 5 ml de solución de patrón de P (20 ppm) + 5 ml de reactivo nitrovanadomolíbico

Procedimiento de análisis de la muestra

En un tubo de ensayo se coloca:

- Tubo de muestra: 5 ml de la muestra mineralizado foliar + 5 ml de reactivo nitrovanadomolibdico.

Se utilizará una micropipeta para la toma de volúmenes, comprobando antes de cada medición la precisión de la misma.

Una vez obtenidos los patrones y la muestra, éstos se agitan con ayuda de un agitador y se deja desarrollar el color durante 30 minutos, tras los cuales, se procede a la medición de los patrones en el espectrofotómetro a una $\lambda = 430$ nm.

Cálculo de la concentración de P en los tubos de 10 ml

Es necesario para la construcción de la curva de calibrado, conocer las concentraciones reales del P en los patrones preparados, las cuales se conocen en función de la siguiente relación:

Concentración tubo = (Volumen de P / Volumen total cubo) + (Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$)

- Patrón 1 = (1ml de P/ 10 ml) X 20 = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$
- Patrón 2 = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$
- Patrón 3 = 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$
- Patrón 4 = 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$
- Patrón 5 = 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$

El espectrofotómetro UV/Vis se encuentra conectado a un ordenador que almacena los datos y nos da la curva de calibrado buscada.

La concentración se representa en abscisas, y la absorbancia en ordenadas, apareciendo en ella representados los datos de la siguiente tabla:

Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$	Absorbancia (A)	Pendiente (b)
0	0	
2	A_2	$b_2 = A_2/2$
4	A_4	$B_4 = A_2/4$
6	A_6	$b_6 = A_2/6$
8	A_8	$b_8 = A_2/8$
10	A_{10}	$b_{10} = A_2/10$

Donde la pendiente media de la curva de calibrado es igual a;

$$B = \Sigma b_i / n$$

Para poder conocer la concentración del P en planta, utilizamos la siguiente fórmula:

$$P \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{Am}{b} \times \frac{10}{5} \times \frac{50}{0,5} = \frac{Am}{b} \times 200$$