

**FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO Y
ALMACENAMIENTO DE CARBONO EN
AGROSISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) EN PUERTO RICO**

por

Ixia Isabel Avilés Vázquez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Skip Van Bloem, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Wigmar González Muñiz, MS
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Eduardo C. Schröder, PhD
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Canny Bellido, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Hipólito O'Farrill, MS
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

Coffee agroforestry systems have been promoted because they have smaller environmental impact than sun grown coffee. The majority of shade grown coffee systems use leguminous trees capable of fixing N_2 from the atmosphere, which can reduce the use of chemical fertilizer. In this study, biological nitrogen fixation was evaluated in leaf litter, lichens, epiphylls and in soil of three ecosystems, sun grown coffee, shade coffee and secondary forest at Jayuya, Lares and Las Marías. The acetylene reduction assay (ARA) was used to measure biological nitrogen fixation for a period of six months. N_2 fixation in leaf litter at the three sites was significantly higher in the forest ecosystem, $71.8 \text{ mg N ha}^{-1} \text{ period}^{-1}$, than in the coffee agrosystems ($34.3 \text{ mg N ha}^{-1} \text{ period}^{-1}$). At Jayuya there was significantly higher N_2 fixation in August and September in the forest ecosystem. Coffee phyllosphere N_2 fixation was similar throughout the six month period and through the agrosystems at the three sites. Average N_2 fixation by lichens was $2.75 \text{ } \mu\text{g N g dry weight}^{-1} \text{ period}^{-1}$, similar throughout the six month period and throughout the ecosystems at all sites. N_2 fixation in soil 0.5 m from *Inga vera* tree at Jayuya and Las Marías was 1.3 times higher than N_2 fixation in soil 1.2 m from *I. vera*. Soil N_2 fixation at shade coffee system was two times higher than sun grown coffee soil. At Lares, no significant differences were found between ecosystems. N_2 fixation in all components studied was lower than other studies. These results suggest that agricultural systems have less capacity of asymbiotic N_2 fixation than other natural ecosystems.

Carbon pools of the different coffee agrosystems were evaluated. Aboveground biomass was calculated with regression equations for these life zones and C stored in biomass was determined. Coffee plants can store nearly $3.74 \text{ ton C ha}^{-1}$, while shade trees can store approximately $21.20 \text{ ton C ha}^{-1}$. Soil can store the largest amount of C in an ecosystem. Soil Carbon pools in sun grown coffee and shade grown coffee were 32.1 and $35.2 \text{ ton C ha}^{-1}$ respectively; in the forest ecosystem C pool in soil was $50.8 \text{ ton C ha}^{-1}$. These results suggest that shade coffee agroforestry systems ($59.65 \text{ ton C ha}^{-1}$) are capable of storing more C on their biomass than sun grown coffee ($36.42 \text{ ton C ha}^{-1}$).

Resumen

Los sistemas agroforestales de café se han estado evaluando por su menor impacto al ambiente que el cultivo de café a pleno sol. En la mayoría de los sistemas agroforestales de café con sombra se utilizan árboles de leguminosas, capaces de fijar N_2 de la atmósfera, por lo que se puede reducir el uso de fertilizantes. En este estudio se midió la entrada de N por medio de la fijación biológica en la hojarasca, epífilos, por líquenes y en el suelo de tres ecosistemas, café a pleno sol, café con árboles de sombra y bosque secundario en los municipios de Jayuya, Lares y Las Marías. Se utilizó la técnica de reducción de acetileno (ARA) para medir la fijación de nitrógeno por un periodo de seis meses. La fijación de N_2 en la hojarasca de las tres localidades fue significativamente mayor en el bosque, $71.8 \text{ mg de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$, que en los agrosistemas de café ($34.3 \text{ mg de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$). En Jayuya hubo significativamente mayor fijación de N_2 en los meses de agosto y septiembre en el ecosistema de bosque. En la filósfera de las plantas de café no se encontraron diferencias significativas en fijación de N_2 entre los meses ni entre los agrosistemas. La fijación de N_2 en líquenes promedio fue $2.75 \text{ } \mu\text{gramos de N g de peso seco}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$, similar a través de los meses y los agrosistemas en todas las localidades. En Jayuya y Las Marías la fijación de N_2 en el suelo a 0.5 m del árbol de *Inga vera* fue 1.3 veces mayor que la fijación a 1.2 m de la *I. vera*. A su vez, la fijación de N_2 en el suelo del café con sombra fue dos veces mayor que en el suelo de café a pleno sol. En la Lares no se encontraron diferencias significativas entre los agrosistemas. La fijación de N_2 en todos los componentes estudiados fue más baja de lo reportado en otros estudios. Los resultados obtenidos sugieren que los sistemas agrícolas tienen menor capacidad de fijar N_2 asimbióticamente que otros sistemas naturales.

Se evaluó la capacidad de los diferentes agrosistemas de café de almacenar carbono. Se calculó la biomasa aérea con ecuaciones de regresión para estas zonas de vida y se determinó la cantidad de C almacenado en la biomasa. Se encontró que las plantas de café pueden almacenar cerca de $3.74 \text{ ton de C ha}^{-1}$ mientras que los árboles de sombra pueden almacenar aproximadamente $21.20 \text{ ton de C ha}^{-1}$. En el café a sol y con sombra el almacenamiento de C en el suelo fue de 32.1 y $35.2 \text{ ton de C ha}^{-1}$ respectivamente y en el bosque el fue de $50.8 \text{ ton de C ha}^{-1}$. Estos resultados sugieren que los sistemas agroforestales de café con sombra tienen la capacidad de almacenar más C en su biomasa ($59.65 \text{ ton de C ha}^{-1}$) que los sistemas de café a pleno sol ($36.42 \text{ ton de C ha}^{-1}$).

© Ixia Isabel Avilés Vázquez, 2009

A mi padre que trabajó toda su vida para que nosotras tuviéramos una educación.

A mi madre que siempre nos ha apoyado y nos inculcó a amar todo lo que hiciéramos.

A mi hermana que ha sido mi inspiración y fortaleza y me ha enseñado a pensar diferente.

A mi tía que ha sido como una segunda madre.

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Schröder por darme la oportunidad de trabajar en el proyecto de árboles de sombra para el café.

Al Dr. Skip Van Bloem por su gran ayuda en todo momento y Wigmar González por la ayuda y aportaciones para el trabajo.

A la Dra. Stefanie Whitmire por su ayuda incondicional especialmente con los cálculos de calibración de acetileno.

Al Dr. Gary Breckon por su ayuda en la identificación de especies de plantas.

Al Sr. Pedro Pons y familia (Finca Buena Vista en Lares), al Sr. William Geraldino Medina y familia (Finca Wendoli en Jayuya), al Sr. Angel Santiago (Finca Serrallés en Jayuya), a Miguel Avilés y Dominga Irrizarry (Las Marías) por permitirnos realizar las investigaciones de campo en sus fincas cafetaleras.

Al personal del departamento de Agronomía y Suelos que me ayudaron durante todo este camino y me brindaron su amistad Gloria Aguilar, Evelyn Rosselló y Lourdes Cataquet.

A los compañeros de trabajo, amigos y amigas que me acompañaron durante alguna etapa de este proceso y me han dado las fuerzas para continuar: Melissa Matos, Lionel Cruz, Feliciano Andújar Amarante, Glenni López Rodríguez, Beatriz Torres, Jorge Lugo, Manuel Santana, Rocío Suárez, Edward Roa, José Miguel García, Manuel Pérez Cuevas, Gerson Ardila, Ronald Dorcinvil, Sonia Carlo, Sol Taína Cintrón Berdecía, María Vega Rodríguez, Víctor y Edwin de la Cruz Montoya y Andrea Cabanzo.

A la familia Gómez Fernández: Milagros, Fino, Vladimir y Jessica por tratarme como un miembro más de su familia.

Índice de Contenido

ABSTRACT	ii
Resumen.....	iii
Agradecimientos	vi
Índice de Contenido	vii
Índice de Tablas	x
Índice de Figuras.....	xii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 EL CULTIVO DEL CAFÉ	5
3.1.1 Orígenes	5
3.1.2 Café en Puerto Rico	5
3.1.3 Suelos de la zona cafetalera en Puerto Rico	6
3.1.4 Necesidades climatológicas del café.....	9
3.1.4.1 Precipitación	9
3.1.4.2 Temperatura	9
3.1.4.3 Intensidad Lumínica.....	10
3.1.5 Cultivo de café a sol y a sombra	10
3.1.6 Necesidades nutricionales del café	12
3.1.7 Ciclo de N en el cafetal.....	13
3.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	14
3.2.1 Fijación Simbiótica	15
3.2.1.1 Simbiosis Rhizobium-leguminosa	15
3.2.1.2 Bacterias Endófitas	16
3.2.1.3 Líquenes.....	17
3.2.1.4 Micorrizas Arbusculares (MA).....	18
3.2.2 Fijación Asimbiótica o Asociativa.....	19
3.2.2.1 Diazotrofos de vida libre.....	19
3.2.2.2 Rizósfera	20
3.2.2.3 Filósfera	20
3.2.3 Factores que afectan la Fijación Biológica de Nitrógeno	21
3.3 MÉTODOS PARA MEDIR FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....	22
3.3.1 Técnica de Reducción de Acetileno (ARA).....	23
3.3.2 Dilución del isótopo ¹⁵ N	24

3.3.3	Abundancia Natural de ^{15}N o Método de $\delta^{15}\text{N}$	24
3.4	SECUESTRACIÓN DE CARBONO	25
3.4.1	Ciclo de Carbono	25
3.4.2	Efecto de Invernadero	26
3.4.3	Agroecosistemas para la secuestración de carbono	27
3.4.3.1	Bosques	27
3.4.3.2	Sistemas agroforestales	28
3.4.3.2.1	Agrosistemas de café con sombra	28
4	MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1	ÁREA DE ESTUDIO	30
4.1.1	Caracterización del área de estudio	32
4.1.1.1	Nivel de iluminación	32
4.2	FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	32
4.2.1	Fijación de nitrógeno en hojarasca	33
4.2.2	Fijación de nitrógeno en filósfera de plantas de café	33
4.2.3	Fijación de nitrógeno en líquenes	34
4.2.4	Fijación de nitrógeno en suelo	34
4.3	CONTENIDO DE NITRÓGENO EN CAFÉ	35
4.3.1	Contenido de ^{15}N en agrosistemas de café en Las Marías	36
4.4	ESTIMACIÓN DE BIOMASA AÉREA Y SECUESTRO DE CARBONO	36
4.4.1	Árboles de sombra en café	36
4.4.2	Plantas de café	36
4.4.3	Árboles en bosque secundario	37
4.4.4	Análisis estadístico	37
5	RESULTADOS	39
5.1	ÁREA DE ESTUDIO	39
5.1.1	Caracterización del área de estudio	39
5.1.1.1	Nivel de iluminación	39
5.2	FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	39
5.2.1	Fijación de nitrógeno en hojarasca	39
5.2.2	Fijación de nitrógeno en la filósfera de plantas de café	42
5.2.3	Fijación de nitrógeno en líquenes	45
5.2.4	Fijación de nitrógeno en suelo	48
5.2.4.1	Suelo de plantas de café	48
5.2.4.2	Suelo de Inga vera	51
5.2.5	Fijación total de nitrógeno	52
5.3	CONTENIDO DE NITRÓGENO EN HOJAS DE CAFÉ	53
5.3.1	Contenido ^{15}N en agrosistemas de café en Las Marías	54
5.4	BIOMASA AÉREA Y ALMACENAMIENTO DE CARBONO	54
5.4.1	Biomasa y carbono almacenado en plantas de café	54
5.4.2	Biomasa y carbono almacenado en árboles de sombra	55
5.4.3	Carbono almacenado en suelo	55
6	DISCUSIÓN	57

6.1	ÁREA DE ESTUDIO	57
6.1.1	Caracterización del área de estudio.....	57
6.1.1.1	Nivel de iluminación.....	57
6.2	FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	57
6.2.1	Fijación de nitrógeno en hojarasca	57
6.2.2	Fijación de nitrógeno en filósfera de plantas de café.....	62
6.2.3	Fijación de nitrógeno en líquenes	65
6.2.4	Fijación de nitrógeno en suelo	68
6.2.4.1	Suelo de plantas de café.....	68
6.2.4.2	Suelo de Inga vera.....	70
6.2.5	Fijación total de nitrógeno	72
6.3	CONTENIDO DE NITRÓGENO EN HOJAS DE CAFÉ.....	73
6.3.1	Contenido ¹⁵ N en agrosistemas de café en Las Marías.....	74
6.4	BIOMASA AÉREA Y ALMACENAMIENTO DE CARBONO.....	76
6.4.1	Biomasa y carbono almacenado en plantas de café.....	76
6.4.2	Biomasa y carbono almacenado en árboles de sombra.....	77
6.4.3	Biomasa y carbono almacenado en sistemas de bosque secundario.....	78
6.4.4	Carbono almacenado en suelo	78
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
8	LITERATURA CITADA	82
9	APENDICES.....	100

Índice de Tablas

Tablas	Página
Tabla 1. Características de los ecosistemas bajo estudio.....	30
Tabla 2. Densidad de plantas de café por agrosistema en Jayuya, Lares y Las Marías.....	31
Tabla 3. Nivel de iluminación en café a sol, café con sombra y bosque en cada localidad.	39
Tabla 4. Fijación promedio mensual de N ₂ en hojarasca por ecosistema en la localidad de Jayuya	41
Tabla 5. Fijación promedio mensual de N ₂ en hojarasca por ecosistema en la localidad de Lares.	41
Tabla 6. Fijación promedio mensual de N ₂ en hojarasca por ecosistema en la localidad de Las Marías.	42
Tabla 7. Fijación promedio de N ₂ en hojas de café por ecosistema en cada localidad.....	43
Tabla 8. Fijación promedio mensual de N ₂ en hojas de café por ecosistema en la localidad de Jayuya.	43
Tabla 9. Fijación promedio mensual de N ₂ en hojas de café por ecosistema en la localidad de Lares.....	44
Tabla 10. Fijación promedio mensual de N ₂ en hojas de café por ecosistema en la localidad de Las Marías.....	44
Tabla 11. Fijación promedio de N ₂ calculada en líquenes por ecosistema en las tres localidades.	45
Tabla 12. Fijación promedio mensual de N ₂ en líquenes por ecosistema en la localidad de Jayuya.	46
Tabla 13. Fijación promedio mensual de N ₂ en líquenes por ecosistema en la localidad de Lares.	46
Tabla 14. Fijación promedio mensual de N ₂ en líquenes por ecosistema en la localidad de Las Marías.	47
Tabla 15. Fijación promedio mensual de N ₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en la localidad de Jayuya.	49
Tabla 16. Fijación promedio mensual de N ₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en la localidad en Lares (g de N ha ⁻¹ mes ⁻¹).....	50
Tabla 17. Fijación promedio mensual de N ₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en la localidad de Las Marías.....	50
Tabla 18. Fijación promedio de N ₂ en suelo por ecosistema en cada localidad.	51
Tabla 19. Fijación total de N ₂ calculada para todos los componentes por ecosistema (g de N ha ⁻¹ periodo ⁻¹).....	52
Tabla 21. Contenido de nitrógeno orgánico total en hojas de café a sol y con sombra en Jayuya, Lares y Las Marías.....	53
Tabla 22. Contenido de ¹⁵ N en hojas de agrosistemas de café en Las Marías.....	54
Tabla 23. Biomasa aérea y contenido de carbono en plantas de café.....	54

Tabla 24. Biomasa aérea y contenido de carbono en árboles de sombra en las plantaciones de café con sombra	55
Tabla 25. Carbono almacenado en el suelo de los tres ecosistemas y localidades	55
Tabla 26. Contenido de C total en los tres agrosistemas	56
Tabla 27. Fijación asimbiótica de nitrógeno en hojarasca de ecosistemas de bosque	58
Tabla 28. Contenido anual de C, N y la razón C:N en la hojarasca proveniente de los ecosistemas en Jayuya, Lares y Las Marías	60
Tabla 29. Propiedades químicas de los suelos estudiados a una profundidad de 0-20 cm en café a sol (CSL), café con sombra (CSM) y bosque (BQS).....	61

Índice de Figuras

Figuras	Página
Figura 1. Mapa zona cafetalera de Puerto Rico (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés 1994)	7
Figura 2. Fijación promedio de N ₂ en hojarasca por ecosistema en las tres localidades (mg de N hectárea ⁻¹ periodo ⁻¹)	40
Figura 3. Fijación promedio de N ₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en cada localidad (g de N hectárea ⁻¹ periodo ⁻¹).....	49

1 INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los elementos de mayor importancia y el más limitante para el crecimiento y la producción de las plantas. A pesar de que aproximadamente 80% de la atmósfera es nitrógeno, las plantas no pueden utilizar este nitrógeno. Por ende, la fijación biológica de nitrógeno es el proceso natural más importante para añadir nitrógeno a los ecosistemas. La fijación simbiótica de nitrógeno es un proceso altamente estudiado en los sistemas agrícolas. Una gran cantidad de estudios en fijación simbiótica de nitrógeno se han realizado en cultivos de café bajo sombra con árboles de leguminosas. Las leguminosas tienen la habilidad de tener una relación simbiótica con un grupo de bacterias que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera. Varios estudios han demostrado que las leguminosas pueden proveer el nitrógeno que necesitan las plantas de café (Roskoski 1982), lo que puede reducir la necesidad de insumos de abono en las fincas. En cambio, la fijación asimbiótica de nitrógeno ha sido poco estudiada en sistemas agrícolas. Los estudios que se han realizado hasta el momento indican que la aportación de nitrógeno por medio de este proceso es sólo de unos pocos kilogramos por hectárea. Sin embargo, algunos autores consideran que a pesar de que ésta sea poca, falta mucho por conocer, y esta fijación puede ser significativa si se considera a nivel global y en áreas donde un ciclo interno de nitrógeno alto junto con tasas de crecimiento lentas disminuye los requisitos de insumos externos (Paul y Clark 1996). Este estudio busca contribuir al conocimiento necesario de la contribución asimbiótica de nitrógeno a los sistemas agroforestales.

El cultivo del café en Puerto Rico ha sido una de las industrias agrícolas más importantes en la Isla desde que éste se introdujo en la isla a mediados del siglo 18. Para el año 2007, había cerca de 15,000 hectáreas (38,100 cuerdas) dedicadas a este cultivo en veinticinco (25) municipios de la parte central de la Isla. Hoy en día el café se mantiene como una de las industrias agropecuarias de mayor importancia económica. En el año 2007, la producción de café se estimó en 180,594 quintales, la cual aportó \$41.8 millones al Ingreso Bruto Agrícola (USDA 2009), un 8 por ciento del valor total de las cosechas.

Hasta finales de la década de los '50, en Puerto Rico, se utilizaban variedades de café tradicionales y se sembraba a bajas densidades bajo la sombra de árboles de leguminosas y otros

árboles frutales (Monroig 2001). En los sesenta el Departamento de Agricultura empieza a promover el cultivo de café a pleno sol (al raso) con el objetivo de obtener mayor producción para el consumo local y para la exportación en el menor cuerdate posible (Monroig 2001). Luego de adoptar estas técnicas se ha visto que este tipo de producción tiene efectos adversos al ambiente y a los cultivos. El café a sol requiere la eliminación de los árboles para sombra lo que provoca una disminución en la biodiversidad, mayor erosión, disminución de la fertilidad de los suelos, aumento en malezas, uso de una mayor cantidad de insumos químicos y un aumento, por ende, de la contaminación de los cuerpos de agua (Perfecto *et al.* 1996). Esto es de gran importancia ya que el café se cultiva mayormente en la zona central de la Isla donde nacen la mayor parte de los cuerpos de agua (Monroig 2001) y en zonas económicamente deprimidas donde el costo de los insumos precisa ser subsidiado. Debido a los efectos ambientales que tiene el cultivo de café al sol y los costos de abono, se ha considerado la reintroducción de árboles de sombra al café.

Entre los árboles que se eliminaron del café en los años 60 se encontraban especies de leguminosas que aportaban a la fertilidad de los suelos del cafetal. Estos árboles poseen una relación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* que en su nodulación producen nitrógeno en su forma accesible para las plantas. Por estas razones, junto con el potencial uso de sistemas agroforestales como fuentes de secuestro de carbono, varias agencias están promoviendo y trabajando con la reintroducción de árboles de sombra al cultivo de café. La sombra reduce la erosión, aumenta la biodiversidad que puede ayudar al control biológico de algunas plagas, y disminuye el crecimiento de malezas. Si se utilizan árboles de leguminosas específicamente, estas pueden proveerle al café el nitrógeno que necesita (Roskoski 1982), lo que puede reducir la necesidad de insumos externos, como abono en las fincas. Además de las leguminosas, la biodiversidad asociada a los sistemas agroforestales como los líquenes, epífitos, endobacterias y bacterias del suelo asociados a los sistemas de café también pueden aportar a la cantidad de nitrógeno disponible en forma asimbiótica para el cultivo.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno contienen la enzima nitrogenasa la cual reduce el dinitrógeno en amonio. En esta investigación evaluamos las entradas de nitrógeno por medio de la fijación asimbiótica y simbiótica en diferentes sistemas de producción de café. Estas entradas se estimaron midiendo la actividad de la nitrogenasa en el suelo (asociada a fijadores de

vida libre, micorrizas y rizobios), en líquenes, en hojarasca y en hojas de café (asociada a bacterias epifitas y endobacterias). Estas medidas se pueden extrapolar a la cantidad de nitrógeno fijado en los sistemas bajo estudio. Además, se estimó la salida de nitrógeno del sistema por medio de la cosecha, la cantidad de nitrógeno en la biomasa y se evaluaron los diferentes sistemas como fuentes de secuestro de carbono.

El conocer la aportación a la producción del cultivo por organismos fijadores de nitrógeno en los sistemas cafetaleros ayudaría a establecer un sistema más eficiente de aplicación de insumos y de manejo de suelo. Se estudiaron también: las entradas de nitrógeno por medio de la fijación de nitrógeno, la salida de nitrógeno por medio de la cosecha en los diferentes sistemas de café a sol y a sombra, y la potencialidad del sistema agroforestal de café como una fuente de secuestro de carbono.

2 OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis fue:

1. Cuantificar la fijación de N_2 por organismos de vida libre y en simbiosis en todos los sustratos donde esta puede ocurrir en agrosistemas de producción de café.
2. Estimar la secuestración de C en los agrosistemas de producción de café.

Como objetivos secundarios:

1. Medir el contenido de nitrógeno secuestrado en la biomasa del cultivo y que eventualmente podría regresar al suelo por medio de la caída de hojas y mineralización.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

Primaria

H₀: No hay diferencia en la fijación de nitrógeno entre los tres sistemas de manejo.

H_a: El sistema de café a sombra expresa una mayor fijación de nitrógeno que el sistema de manejo de bosque o café al raso.

Secundaria

H₀: No existe diferencia en el contenido o proporción de absorción de carbono y nitrógeno entre los tres sistemas de manejo.

H_a: El sistema de manejo de café a sombra exhibe una mayor cantidad y proporción de absorción de carbono y nitrógeno que el sistema de café a sol.

3 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 El Cultivo del Café

3.1.1 Orígenes

La planta de café es originaria de Abisinia (Etiopía). Se cree que los árabes lo llevaron de Abisinia al Yemen por el puerto de Mocha, Arabia donde lo cultivaron cerca del año 575 A. D. (Oficina Internacional de las Repúblicas Americanas 1902). Este llegó a Puerto Rico desde Santo Domingo para mediados del siglo 18 (Oficina Internacional de las Repúblicas Americanas 1902), convirtiéndose en uno de los cultivos más importantes en la economía agrícola del país debido a su alto precio en el mercado y menor costo en producción que la caña de azúcar.

En Etiopía el café crecía en zonas de bosque húmedo subtropical a altitudes de 1600 a 2000 metros. La temperatura promedio en estos bosques es de 20°C; la precipitación está bien distribuida con no más de 3 a 4 meses consecutivos secos con menos de 50 mm y un total anual de 1600 a más de 2000 mm y relativamente alta nubosidad especialmente en la época de lluvia (Sylvain 1955). Este formaba parte de un complejo de bosque de cuatro estratos, dos estratos de árboles y dos de arbustos. La capa superior de 30-40 metros de alto con árboles dominantes de especies de los géneros *Albizia*, *Celtis*, *Chrysophyllum*, *Clausenopsis* y *Cordia*. El segundo estrato de aproximadamente 10 a 20 metros compuesto de *Bersama*, *Bridelia*, *Croton*, *Ehretia*, *Ekbergia*, *Ficus*, *Morus*, *Polyscias*, *Pygeum* y *Syzygium*. Los dos estratos de arbustos compuestos por *Carissa*, *Coffea*, *Gymnosporia* y *Sideroxylon* entre otros (Sylvain 1955).

3.1.2 Café en Puerto Rico

Desde la llegada del café a la Isla a mediados del siglo 18, éste se convirtió en una de las industrias agrícolas más importantes. Para los 1890, Puerto Rico era el cuarto país exportador de café en Las Américas. Hoy en día se mantiene como una de las industrias agropecuarias de mayor importancia económica principalmente para la zona montañosa.

Actualmente el café en Puerto Rico se siembra principalmente a pleno sol o al raso en fincas pequeñas y medianas. A su llegada, este se cultivaba con otros árboles frutales que servían de alimento y estos a su vez le proporcionaban sombra a las plantas de café (Bergad 1983). Para la época de 1950 a 1970 en varios países se comienzan a adoptar técnicas de producción modernas e industrializar la producción de diversos cultivos, esta época se conoció como la revolución verde. La revolución verde tenía como objetivo aumentar la producción y reducir la cantidad de tierra necesaria para producción mientras le daba un estímulo económico a las grandes industrias de agroquímicos. Como parte de la modernización del cultivo del café se elimina la sombra permanente, se utilizan variedades nuevas que responden a fertilizantes químicos y se aumenta la densidad de siembra del arbusto de café (Rice y Ward 1996). Debido a problemas de producción y altos costos del cultivo del café, para los años 60, se decide implementar en Puerto Rico la práctica de cultivo al sol e intensificación del cultivo para aumentar la producción (Vicente-Chandler *et al.* 1968), práctica que continuó implementándose hasta después de los años 80 (Servicio de Extensión Agrícola 1987).

A pesar de los incentivos e implementación general del cultivo intensivo al sol, muchos agricultores mantuvieron parte de sus cultivos con sombra; mayormente utilizando como árbol de sombra, la guaba (*Inga vera*). Hoy en día, sólo se recomienda una sombra permanente de no más de 30% en lugares donde el clima es muy caliente, expuestos a fuertes vientos, así como en las siembras donde el agricultor no posee los medios económicos suficientes para costear los insumos que demandan las prácticas agrícolas en el cultivo intensivo al sol (Conjunto Tecnológico para la Producción de Café 1999). Esto debido a estudios realizados por Abruña *et al.* (1965) donde encontraron que el café cultivado intensivamente al sol produce un 40% más que el cultivado intensivamente con 30% de sombra. Actualmente se cultivan en Puerto Rico 10,502 hectáreas (26,728 cuerdas) de café a pleno sol y 4,639 hectáreas (11,807 cuerdas) con sombra (USDA 2009).

3.1.3 Suelos de la zona cafetalera en Puerto Rico

La región cafetalera de Puerto Rico comprende los municipios de Adjuntas, Lares, Jayuya, Las Marías, San Sebastián, Maricao, Yauco y Utuado. En menor intensidad se cultiva en

Añasco, Ciales, Juana Díaz, Guayanilla, Mayagüez, Moca, Peñuelas, Orocovis, Ponce, Sabana Grande y Villalba (Figura 1). En estos pueblos se encuentran mayormente los siguientes órdenes de suelo:

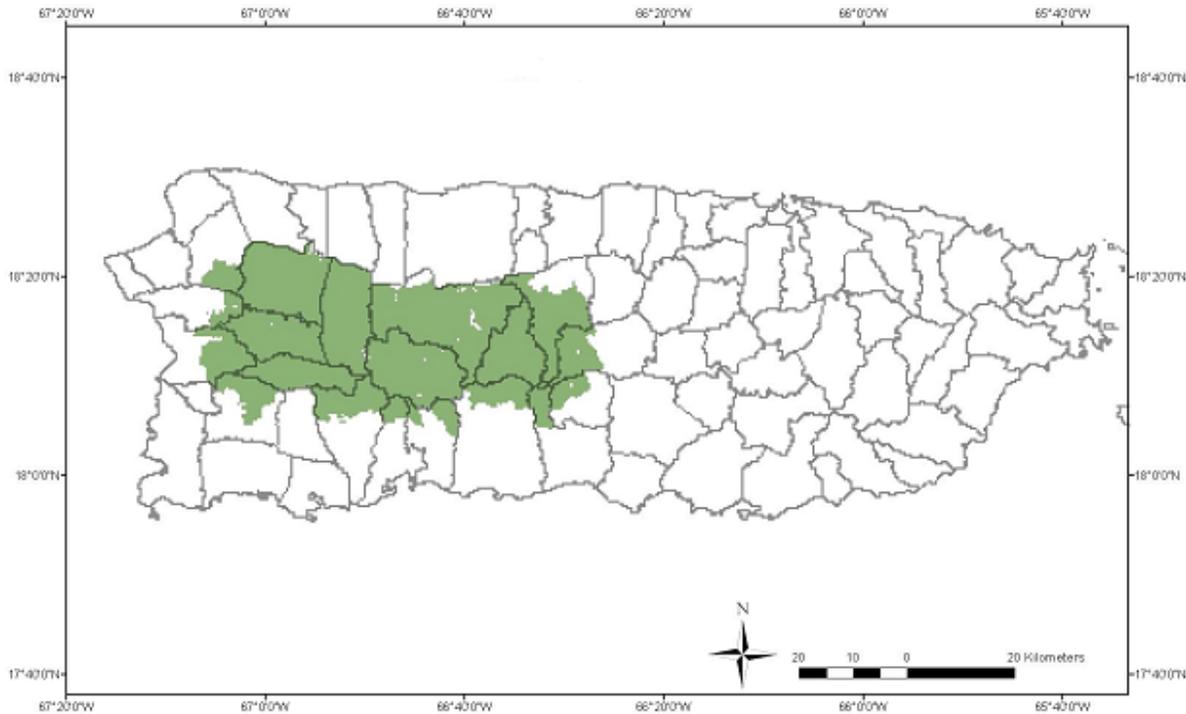


Figura 1. Mapa zona cafetalera de Puerto Rico (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés 1994)

Inceptisoles: Estos son suelos con poca diferenciación. Tienen un subsuelo moderadamente meteorizado (horizonte cámbico) pero no otros horizontes (Giller 2001). Entre las series principales que se encuentran en la región cafetalera de Puerto Rico están: Adjuntas, Anones, Caguabo, Callabo, Maragüez, Morado, Múcara, Pellejas y Quebrada. Una de las limitaciones principales de estos suelos es su poca profundidad ya que la raíz pivotal del cafeto crece aproximadamente 90 cm. Además, el material suelto que contienen y las pendientes abruptas los hacen muy susceptibles a la erosión con las altas y fuertes lluvias de la zona (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés 1994).

Ultisoles: Los ultisoles cubren 41.6 % de la zona cafetalera. Generalmente contienen más minerales meteorizables que los Oxisoles pero tienen una estructura más pobre y tienen baja

fertilidad (Giller 2001). Son suelos de avanzado estado de meteorización y por lo tanto, son suelos maduros con arcillas de poca actividad.

Las series principales que se encuentran en la zona cafetalera son: Alonso, Consumo, Humatas, Ingenio, Lares, Lirios y Maricao. Estos suelos son ácidos y de fertilidad natural baja, pero bien manejados pueden ser altamente productivos. Son suelos más estables que los Inceptisoles y generalmente profundos y bien drenados (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés 1994).

Oxisoles: Son suelos altamente meteorizados que ocurren mayormente en regiones tropicales o subtropicales. Se encuentran en superficies de terrenos viejos o en sedimentos que se derivan de ellos aunque también se pueden formar en materiales altamente meteorizables (Van Wambeke *et al.* 1983). La característica principal de los Oxisoles es que tienen un horizonte óxico, de alta concentración de óxidos de hierro y aluminio con una baja capacidad de intercambio catiónico. Usualmente son suelos bien profundos, bien drenados, rojos o amarillos con baja fertilidad pero estructura física excelente (Giller 2001). Son ácidos y generalmente rojizos (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés 1994).

Las series principales que se encuentran en la zona cafetalera de Puerto Rico son: Catalina, Nipe, Rosario, Dagüey y Los Guineos. Las limitaciones principales de estos suelos son la baja fertilidad y acidez. Los problemas de baja fertilidad se pueden manejar al igual que los Ultisoles (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés 1994).

Las series de suelo recomendadas para el cultivo de café en Puerto Rico son: Humatas, Alonso, Catalina, Dagüey (Cialitos) y los Guineos. Estos suelos son profundos con un contenido de 3 a 6% de materia orgánica, moderadamente pesados de buen drenaje y pH de 4.0 a 5.5 de acidez. Se consiguen altas producciones de café en estos suelos abonando, encalando y realizando prácticas de conservación de suelos. Suelos sueltos o muy pedregosos no son apropiados para el cultivo del café (Conjunto Tecnológico para la Producción de Café en Puerto Rico 1999). El café debe sembrarse en suelos con pH de 5.5 a 6. Los suelos muy ácidos o alcalinos provocan el desarrollo anormal de los arbustos haciéndolos más susceptibles a insectos y enfermedades (Conjunto Tecnológico para la Producción de Café en Puerto Rico 1999).

La mayoría de las series de suelo en la zona cafetalera se caracterizan por tener pH bien bajo. Se conoce que el pH de los suelos tiene un efecto en la fijación de nitrógeno y en los rizobios. Los rizobios crecen y sobreviven muy poco en suelos con pH de 4.5 a 5. Los suelos con pH bajo generalmente tienen baja disponibilidad de P. El suministro y la disponibilidad de P son una gran limitación para la fijación de N₂ (Sadowsky 2005). El tamaño de los agregados del suelo también va a tener efecto en el crecimiento de bacterias diazotróficas y en la fijación de N₂. Agregados con espacio de poros más pequeños tienen ambientes más favorables para el crecimiento de rizobios y muchos microorganismos (Turco y Sadowsky 1995).

3.1.4 Necesidades climatológicas del café

3.1.4.1 *Precipitación*

El café crece a un amplio rango de condiciones de lluvia pero se ha establecido que el rango óptimo de lluvia anual es de 1200 a 1800 mm (Alègre 1959). Un periodo de sequía de 2 a 4 meses es importante para promover la florecida, el crecimiento de la raíz, la maduración de las ramas formadas durante el periodo lluvioso previo, iniciación de flores y la maduración de los frutos (Haarer 1958, Maestri y Santos 1987). La lluvia abundante a través del año puede causar una cosecha dispersa y baja producción. La falta de un periodo seco puede limitar el cultivo de café en regiones del trópico (Maestri y Barros 1977).

En Puerto Rico la precipitación en la zona cafetalera varía de 1900 a 2500 mm durante el año. Ésta está bien distribuida durante el año y existe un periodo de sequía desde fines de diciembre hasta principios de abril (Conjunto Tecnológico para la Producción de Café 1999).

3.1.4.2 *Temperatura*

Se ha establecido que el rango de temperatura óptima promedio anual para el cultivo de café es de 18 a 21°C (Alègre 1959). Cerca de los 26°C la tasa fotosintética es óptima (Kumar y Tieszen 1980). A temperaturas inferiores de 24°C la fotosíntesis está en función de la luz,

mientras que a temperaturas superiores aumenta la concentración de CO₂ y disminuye la materia seca (Nunes *et al.* 1968). Altas temperaturas pueden inhibir el crecimiento ya que a medida que ésta aumenta, la tasa fotosintética en las plantas disminuye (Vaast 2005, Kumar y Tieszen 1980, Nunes *et al.* 1968). Temperaturas por debajo de 16°C por periodos largos inhiben el crecimiento y el desarrollo del cafeto (Algre 1959). La temperatura en la zona cafetalera de Puerto Rico fluctúa entre 20° y 27°C con un promedio anual de 24°C (Conjunto Tecnológico para la Producción de Café 1999).

3.1.4.3 Intensidad Lumínica

Originalmente se creía que el café crecía mejor a la sombra de otros árboles ya que así crecía en su lugar de origen, Etiopía. Sin embargo, algunos autores lo clasifican como una especie facultativa de sombra, exhibiendo características de plantas adaptadas al sol y atributos de aclimatación a la sombra además de una alta capacidad de resistir la transición sombra:sol (Fahl *et al.* 1994).

Varios estudios han determinado que el aumento en intensidad de luz aumenta el consumo de N y la tasa fotosintética (Fahl *et al.* 1994, Yamaguchi y Friend 1979) mientras que otros han encontrado mayor tasa fotosintética en hojas con sombra que hojas a sol a saturación de luz, 300 a 600-700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kumar y Tieszen 1980). Vaast (2005) concluye que se obtiene una actividad fotosintética óptima en las hojas de café con un nivel de radiación fotosintéticamente activa en el rango de 400 a 1200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, no hay definiciones concretas y científicas del nivel de irradiación que necesitan las plantas de café para un crecimiento y producción óptima (DaMatta 2004).

3.1.5 Cultivo de café a sol y a sombra

En las plantaciones de café al sol se elimina la mayoría o todos los árboles de sombra, exponiendo el cultivo a la luz directa. El suelo, al tener menos diversidad de árboles (monocultivo) y menos materia orgánica se expone a mayor grado de erosión, aumenta el crecimiento de malezas y se disminuye el reciclaje de nutrientes. Las plantaciones son más

susceptibles a plagas y enfermedades, por lo que este sistema se hace más dependiente de grandes cantidades de fertilizantes químicos, plaguicidas, el uso de maquinaria y trabajo intensivo todo el año (Moguel y Toledo 1999, Rice y Ward 1996). De todo el fertilizante que se le aplica a los cultivos, estos sólo utilizan una parte, el resto se pierde por lixiviación lo que causa la contaminación por eutroficación de ríos y aguas subterráneas (Tinker 1997).

En cambio, en las plantaciones de café con sombra, las raíces de los árboles ayudan a retener el suelo en su sitio y las hojas a su vez reducen el impacto de las gotas de lluvia, minimizando la erosión. Los árboles de sombra ayudan a disminuir la temperatura del ambiente hasta 4-5°C, creando condiciones microclimáticas favorables en zonas calurosas (Vaast 2005) y reducen la velocidad del viento en localidades expuestas a éstos (Monroig 1997). El uso de la sombra disminuye el crecimiento de malezas y se reducen los costos de control. Además, se podrían disminuir las poblaciones de broca al igual que en las plantaciones de café a pleno sol y aumentar la actividad del controlador natural *Beauveria bassiana* con un manejo adecuado de la sombra (de 40-50%) (Féliz 2003).

Algunos estudios indican que la sombra tiende a mejorar la calidad del café y aumentar el peso y tamaño del grano como también promueve mejor llenado y una maduración más uniforme del fruto (Vaast 2005, Muschler 2001). La plena exposición solar de los cafetos induce estrés a la planta lo que disminuye las actividades fisiológicas. En cambio, la presencia de árboles de sombra reduce el estrés de calor y mejora el crecimiento y productividad (Vaast 2005). Estas condiciones promueven una florecida y cosecha más regular a diferencia de las plantaciones sin sombra donde la cosecha tiende a alternarse entre años lo que lleva a una producción bienal (Vaast 2005, DaMatta 2004).

Los árboles de sombra pueden actuar como bombas biológicas y mejorar el ciclo de nutrientes. Las raíces de los árboles se pueden extender a perfiles del suelo (horizontes B y C) más profundos que las raíces del café y pueden extraer nutrientes de estas porciones del perfil. Estos nutrientes luego son translocados a partes aéreas del árbol y a una masa de raíces mucho más grande en los horizontes de la superficie (horizontes A y B). La translocación de nutrientes de horizontes más profundos a la superficie del suelo se completa con la caída de hojarasca

(MacDicken y Vergara 1990). La hojarasca, ramas, troncos y raíces en descomposición de los árboles de sombra proveen nutrientes y mantienen el contenido de materia orgánica en el suelo conservando la humedad del suelo (Monroig 1997).

En Costa Rica se ha encontrado que la introducción de árboles de sombra incrementa la biomasa total y la demanda evaporativa del sistema, lo que a su vez reduce la lixiviación de N y la contaminación del agua subterránea (Vaast 2005). Si se utilizan árboles de leguminosas para sombra, estos pueden proveer el nitrógeno que necesitan las plantas de café (Bornemisza 1982). Las leguminosas también pueden aumentar la cantidad de N potencialmente disponible en el suelo (Mogollón *et al.* 1997) y la mineralización de N (Babbar y Zak 1994, Beer *et al.* 1998, Zuluaga 2004, López 2008). Por medio de la biomasa que producen las leguminosas se puede añadir hasta 144 kg de N hectárea⁻¹ (Montenegro-Gracia 2005). Leblanc *et al.* (2006) sugieren que la cobertura en el suelo de *Inga* spp. puede aumentar la secuestación de C y la acumulación de N a largo plazo en el suelo. Estos agrosistemas pueden mantener la productividad del cultivo por más tiempo si se disminuye o elimina la fertilización y pueden ser más efectivos para el reciclaje de nutrientes (Romero-López 2006).

3.1.6 Necesidades nutricionales del café

De entre los nutrientes del suelo que absorbe la planta de café, el nitrógeno es el más importante basado en la cantidad de nutrientes requeridos por el cultivo. Las plantas necesitan por lo menos 30 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ para su crecimiento (Bornemisza 1982). Debido a estas necesidades minerales al cultivo del café se le aplican grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados. Gran parte de este nitrógeno la planta no lo puede absorber y se pierde por lixiviación lo que lleva a la contaminación de ríos y aguas subterráneas. En Puerto Rico, se le ha suministrado cantidades excesivas de fertilizante a los cultivos de café, ya que estos han sido subsidiados por el gobierno. En los últimos años los subsidios del Departamento de Agricultura han ido disminuyendo por lo que se les está aplicando a las plantaciones menos cantidad de fertilizante del que recomienda el Conjunto Tecnológico para la Producción de Café (1999).

Debido a la disminución en subsidios y altos costos de los fertilizantes, se deben buscar formas alternas para aumentar la fertilidad de los suelos cafetaleros.

Las leguminosas arbóreas, por medio de la fijación biológica de nitrógeno y los residuos de hojas y ramas, pueden proveerle a las plantas de café parte del nitrógeno que necesitan para su crecimiento. En estudios realizados en México en plantaciones de café con sombra, se ha visto que la leguminosa *Inga jinicuil* puede suplir a las plantas de café con todo el nitrógeno que necesitan ($40 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) (Roskoski 1982). Por otro lado, los residuos de los árboles fijadores de nitrógeno pueden contribuir más de $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Harmand *et al.* 2007b, Aranguren *et al.* 1982).

3.1.7 Ciclo de N en el cafetal

El café necesita por lo menos $30 \text{ kg N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ para su crecimiento. El N se le provee mayormente por medio de la fertilización. Aparte de la fertilización, el N puede entrar al sistema por fijación biológica de N. En las plantaciones de café bajo sombra, la fijación de N_2 es una fuente importante de N para el café. Los árboles fijadores de N_2 , dependiendo de la especie, edad y capacidad de fijar N_2 , pueden añadir hasta $110 \text{ kg de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Escalante *et al.* 1984, Hogberg y Kvarnstrom 1982, Roskoski 1981) al agrosistema.

Otra forma en que puede entrar N al sistema es por medio de la mineralización de N. En algunos sistemas con baja densidad de café y muchos árboles de sombra la mineralización puede ser la fuente principal de N (Bornemisza 1982). En agrosistemas de café con sombra en Puerto Rico se pueden añadir hasta $96 \text{ kg de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y hasta $49 \text{ kg de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ en agrosistemas de café a sol (López 2008). Otros estudios han demostrado que la mineralización de N en los agrosistemas de café a sombra tiende a ser mayor que en los agrosistemas de café a sol (Babbar y Zak 1994, Zuluaga 2004).

Las salidas de nitrógeno incluyen el que sale por medio de la cosecha y las pérdidas por lixiviación y volatilización. Por medio de la cosecha se pueden extraer del sistema de 25 a $120 \text{ kg N hectárea}^{-1} \text{ cultivo}^{-1}$. De esto puede regresar al sistema entre 8 y $40 \text{ kg N hectárea}^{-1} \text{ cultivo}^{-1}$

si la pulpa y desechos del procesamiento se devuelven al sistema (Bornemisza 1982). En plantaciones de café bajo sombra se puede añadir mayor cantidad de N por mineralización de la hojarasca de lo que se pierde por la cosecha (Aranguren *et al.* 1982). Por medio de la poda de árboles de sombra también se puede eliminar el N contenido en la biomasa de las ramas y hojas si estos se eliminan del sistema. Si los residuos de la poda se mantienen en el sistema se pueden añadir hasta 340 kg de N hectárea⁻¹ año⁻¹ (Beer *et al.* 1998).

A medida que se aumentan las aplicaciones de nitrógeno, incrementan las pérdidas por lixiviación y volatilización. En sistemas de café con sombra y a sol se pueden perder por lixiviación de 9 a 24 kg NO₃-N hectárea⁻¹ año⁻¹ del sistema, respectivamente (Babbar y Zak 1995). Por medio de la volatilización o desnitrificación, se pueden perder de 4.3 a 5.8 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Harmand *et al.* 2007b). Sin embargo, Vaast (2005) encontró mayores emisiones de N₂O en cafetales a pleno sol que en sistemas bajo sombra, durante la estación lluviosa. La tasa de desnitrificación aumenta a medida que aumentan las adiciones de carbono y las condiciones anaeróbicas (Babbar y Zak 1995).

Las plantas de café pueden contener en su biomasa de 99.5 a 181 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ en sistemas de café con laurel (árbol no fijador de N₂) y café con poró (*Erythrina poeppigiana*) (Alpizar *et al.* 1985). A su vez los árboles de sombra pueden contener entre 187 a 718 kg de N ha⁻¹ (Alpizar *et al.* 1985, Dossa *et al.* 2008), mientras que en un sistema de café a pleno sol el café puede acumular entre 326 a 337 kg de N ha⁻¹ en su biomasa (Quintero y Ataroff 1998, Dossa *et al.* 2008).

3.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

La atmósfera tiene aproximadamente 80% de nitrógeno (N₂), pero las plantas no pueden utilizarlo de esta forma. Para que las plantas puedan utilizar el nitrógeno éste debe ser primero reducido y luego fijado en iones amonio (NH₄⁺). Este proceso, conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN), lo llevan a cabo un grupo de microorganismos especializados como son las cianobacterias, bacterias y actinomicetes.

Según Newton (2000), de todo el nitrógeno fijado, la fijación biológica provee el 65%, la producción de fertilizantes industriales el 25% y procesos abióticos naturales (relámpagos, combustión y actividad volcánica) el 10%. De la fijación biológica de nitrógeno se pueden producir de 90-130 Tg N año⁻¹ (Galloway 1998, Peoples *et al.* 1995). El nitrógeno que se obtiene de la FBN de las asociaciones simbióticas entre rizobios y las plantas leguminosas varía de varias decenas a 350 kg N ha⁻¹ año⁻¹ dependiendo de las asociaciones (Philippot y Germon 2007). La eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno va a depender de la disponibilidad de nitrógeno mineral y su disminución por la aplicación de fertilizante nitrogenado (Waterer *et al.* 1994). La fijación biológica de nitrógeno es importante en la agricultura porque provee una fuente de nitrógeno para el crecimiento de las plantas que no requiere el uso de combustibles fósiles para su producción y distribución. Además es un aporte de N más sincronizado con las necesidades de las plantas.

La capacidad de fijar nitrógeno de los microorganismos se debe a que producen la enzima nitrogenasa. Esta es la que se encarga de romper el triple enlace de N₂ para convertirlo en amonio (NH₄⁺). La nitrogenasa está compuesta de un complejo de dos proteínas con átomos de hierro (Fe). Una conocida como la proteína 2 o ferroproteína, contiene 4 átomos de Fe y 4 de azufre (S). La otra proteína conocida como proteína 1 o proteína FeMo (ferromolibdenoproteína), compuesta de 28 a 32 átomos de Fe, 28 de S y 2 de Mo. Ambas proteínas son necesarias para la actividad de la nitrogenasa. En el proceso de reducción se llevan a cabo una serie de pasos que necesitan varias enzimas y mucho ATP. Además de reducir el N₂, la nitrogenasa puede reducir otros compuestos de nitrógeno con triple enlace como el acetileno (C₂H₂), propiedad que se utiliza como método para medir la actividad de la nitrogenasa.

3.2.1 Fijación Simbiótica

3.2.1.1 Simbiosis *Rhizobium-leguminosa*

Los rizobios, que incluye los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, son bacterias que se pueden encontrar en el suelo naturalmente. Estas son capaces de formar asociaciones simbióticas con la mayoría de las

especies de plantas de la familia Leguminosae y las plantas del género *Parasponia* (Sprent y Parsons 2000). En estas plantas, los rizobios forman nódulos, en las raíces o en el tallo, en donde transforman el nitrógeno atmosférico a amonio.

Esta asociación le puede proveer a la planta nodulada el nitrógeno que necesita para su mantenimiento como también le puede proveer nitrógeno a otros cultivos. Snoeck *et al.* (2000) encontraron que del nitrógeno fijado por una leguminosa, cerca del 30% se transfiere a las plantas de café asociadas a esta. A su vez, la hojarasca de las leguminosas arbóreas puede proveer hasta 300 kg de N ha⁻¹ por año (Escalante *et al.* 1984) como también pueden acumular nitrógeno por largos periodos de tiempo en el suelo (Leblanc *et al.* 2006). Anualmente, se estima que los aportes de nitrógeno por fijación biológica son de 139 a 170 millones x 10⁶ ton de N (Peoples *et al.* 1995). Los insumos que reciben los cultivos de la fijación biológica de nitrógeno son utilizados casi en su totalidad mientras que de los insumos que se proveen por la fertilización nitrogenada sólo se puede aprovechar aproximadamente un 50%.

3.2.1.2 Bacterias Endófitas

Otro tipo de asociación de diazotrofos es en la cual la bacteria (endófita) se localiza en el interior de la raíz, el tallo y las hojas de la planta sin causarle daño. Esta asociación puede ser más beneficiosa para las bacterias ya que la disponibilidad de nutrientes en el interior de las plantas es mayor que en la rizósfera y podrían brindar beneficios más directos a la planta (James 2000).

En algunas especies de gramíneas, como la caña de azúcar y el arroz, se ha visto que pueden obtener gran parte del nitrógeno que necesitan por medio de la fijación biológica de nitrógeno (James 2000). Esta fijación puede estar relacionada a los diazotrofos *Glucanacetobacter* (antes *Acetobacter*) *diazotrophicus* y *Herbaspirillum* spp., las cuales han sido aisladas de los tejidos de estos cultivos (Boddey *et al* 1995).

En el café, se aisló la bacteria fijadora de nitrógeno *Glucanacetobacter diazotrophicus* de tejidos de la planta y de la rizosfera (Jimenez-Salgado *et al* 1997). Recientemente, también se

aisló *Burkholderia* sp. de tejido de maíz y de café . Este género es rico en bacterias fijadoras de nitrógeno, por ejemplo, se ha encontrado que *Burkholderia vietnamiensis* promueve el crecimiento de maíz, la producción de cultivo y suprime muchos patógenos del suelo (Estrada-de los Santos *et al* 2001).

3.2.1.3 Líquenes

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un hongo y un alga o cianobacteria (fotobionte). El fotobionte le provee compuestos nitrogenados y carbohidratos al hongo y este le suministra protección, agua y minerales al fotobionte (Hill 2001). La simbiosis entre estos dos organismos le permite a los líquenes vivir en diferentes hábitats, desde los trópicos hasta regiones polares. Se pueden encontrar principalmente en lugares que las plantas no pueden crecer como por ejemplo, en los troncos de los árboles y rocas. En agrosistemas de café se ha encontrado que la población de líquenes aumenta a medida que aumenta la edad de las plantas (VanDunné y Wolf 2001).

Algunos líquenes son capaces de fijar nitrógeno del aire. Este nitrógeno se puede hacer disponible para las plantas por medio de los compuestos de nitrógeno exudados de los líquenes, de los desechos enriquecidos de nitrógeno de invertebrados que se alimentan de estos y cuando se liberan los compuestos nitrogenados de los líquenes muertos (Fagg 2003). Los líquenes fijadores de nitrógeno pueden aumentar el estado del nitrógeno en su ambiente directamente (Millbank 1978). En un estudio realizado en un ambiente controlado con *Peltigera membranacea*, *Peltigera polydactyla* y *Lobaria pulmonaria*, encontraron que el insumo total de nitrógeno por reducción de acetileno fue de 4 a 6 kg ha⁻¹ por año (Millbank 1981). *Peltigera* puede contribuir hasta 193 kg N lixiviado/año a los bosques del noreste de Minnesota (Knowles *et al.* 2004). En bosques lluviosos de Hawaii se ha encontrado que los líquenes y briofitas pueden aportar de 0.2 a 1 kg de N hectárea⁻¹ anualmente (Matzek y Vitousek 2003). Además de la contribución que pueden hacer los líquenes directamente por sus exudados, en las Montañas Centrales de Negev en Israel se ha encontrado que los caracoles que se alimentan de los líquenes fijadores de nitrógeno pueden contribuir hasta 11% del total de insumos de nitrógeno en el suelo (Jones y

Shachak 1990). Estudios han encontrado que hay una asociación con talos de *Peltigera* con aumentos significativos en la disponibilidad de N en el suelo, N potencialmente mineralizable y % de N (Knowles *et al.* 2004).

3.2.1.4 Micorrizas Arbusculares (MA)

El término micorriza lo utilizó Frank por primera vez en 1885 para describir la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas y los hongos (Suresh y Bagyaraj 2002). Las MA pueden interactuar simbióticamente con aproximadamente un 90% de todas las especies de plantas (Bonfante y Perotto 1995). Estas están envueltas en procesos como ciclo de nutrientes, mantenimiento de la estructura del suelo, salud de la planta y el aumento en la fijación de nitrógeno por rizobios (Brimecombe *et al.* 2001).

Las micorrizas pueden interactuar con rizobios y con diazotrofos de vida libre para proveerle a la planta más nitrógeno. En la interacción con rizobios, estos le proveen nitrógeno a la planta y las micorrizas facilitan la absorción de iones, principalmente fosfatos, en las raíces (Saxena *et al.* 2002). Se ha visto que cuando se inocula con micorrizas y rizobios aumenta el número de nódulos y la biomasa significativamente (Saxena *et al.* 1997). Además, la presencia de MA puede estimular las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en algunos cultivos como el arroz (Raimam 2007). Las MA ayudan a las leguminosas noduladas a fijar nitrógeno de la atmósfera y en la absorción de éste a la planta.

La interacción entre micorrizas y diáztrofos de vida libre también puede ser muy beneficiosa para las plantas. Se ha probado que el diazotrofo de vida libre, *Azospirillum* puede aumentar los rendimientos de diferentes cultivos (Okon y Labandera-Gonzalez 1994). El rendimiento de estos a su vez puede mejorar con la asociación micorrizas (Tilak y Singh 1988). En el café se ha visto que cuando se inocula con MA y *Azospirillum brasilense*, aumenta el crecimiento de la planta, la colonización de MA y la absorción de P, N y de los micronutrientes Fe, Cu, Zn y Mn (Kumari y Balasubramanian 1993).

3.2.2 Fijación Asimbiótica o Asociativa

3.2.2.1 *Diazotrofos de vida libre*

Existen bacterias de vida libre que pueden fijar N₂ en la descomposición de hojarasca y material orgánico del suelo. Las bacterias que fijan N₂ asimbióticamente se pueden encontrar en todos los ecosistemas terrestres (Paul y Clark 1996). El género de bacterias *Azotobacter* tiene la habilidad de fijar nitrógeno aeróbicamente pero muchas especies de este género necesitan pH neutro y por lo tanto, no son tan abundantes en suelos tropicales excepto en algunos suelos del trópico húmedo (Döbereiner y Pedrosa 1987). Los miembros del género *Beijerinckia* son más tolerantes a pH bajos y por lo tanto, son más comunes en suelos tropicales (Giller 2001). Otro género de bacterias que puede ser importante en los suelos del trópico lo es *Derxia* aunque no se han encontrado asociaciones específicas con raíces de plantas (Giller 2001). Algunas cepas clasificadas como *Pseudomonas* son organismos muy comunes en la rizósfera y algunas tienen la habilidad de fijar nitrógeno. Otro grupo que posee especies fijadoras de nitrógeno lo es *Enterobacteriaceae*, el ejemplo más notable lo es *Klebsiella pneumoniae*. Estas bacterias (diazotrofos) de vida libre pueden contribuir a la disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

La cantidad de nitrógeno fijado por diazotrofos de vida libre como *Azotobacter*, *Pseudomonas* (Paul y Clark 1996), *Beijerinckia*, *Derxia* y *Klebsiella pneumoniae* (Gajendiran y Mahadevan 1989) generalmente son pocos kilogramos por hectárea. Los rangos de fijación de nitrógeno asimbiótico están entre < 0.01- 8 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Vitousek *et al.* 2002, Son 2001, Limmer y Drake 1996, Boring *et al.* 1988, Jones y Bangs 1985). Las cantidades de nitrógeno que pueden fijar los microorganismos asimbióticamente, están estrechamente relacionadas con el contenido de materia orgánica, siendo mucho más altas en residuos leñosos y en capas orgánicas que en suelo mineral (Pérez *et al.* 2003, Jurgensen *et al.* 1991); aunque en bosques templados del hemisferio norte se ha encontrado mayor fijación de N₂ en suelo mineral (Pérez *et al.* 2003).

Los principales fijadores de nitrógeno de vida libre que se han estudiado lo son *Azospirillum* y *Azotobacter*. *Azospirillum* tiene la capacidad de promover el rendimiento de cultivos agrícolas importantes en diferentes suelos y regiones climáticas (Okon y Labandera-

Gonzalez 1994). De igual forma *Azotobacter* puede aumentar el rendimiento y el crecimiento de las plantas (Singh *et al.* 2003, Piao *et al.* 2005). Cuando estas se inoculan con hongos micorrizicos en cultivos importantes pueden aumentar los rendimientos significativamente.

3.2.2.2 Rizósfera

La rizósfera comprende una zona estrecha del suelo alrededor de la superficie de la raíz, de 0 a 2 mm, que está directamente influenciada por las raíces (Bertin *et al.* 2003). Estas pueden influenciar su alrededor debido a los compuestos que producen y secretan a la rizósfera, conocidos como exudados. Los exudados de la raíz incluyen compuestos de C, iones, oxígeno y agua, los cuales pueden afectar las propiedades químicas, físicas y biológicas de su alrededor inmediato (Uren 2001).

La superficie de la raíz puede proveer un ambiente muy favorable en nutrientes para muchas especies de bacterias y hongos (Brimecombe *et al.* 2001), las cuales pueden ser beneficiosas o dañinas. La asociación entre bacterias y plantas mejor conocida en la rizósfera es la asociación entre los rizobios y las leguminosas. Además de esta, pueden existir asociaciones con diazotrofos de vida libre. Esta asociación puede promover el crecimiento de las plantas, tanto por las secreciones de sustancias parecidas a las fitohormonas como por la fijación de nitrógeno.

Los exudados de las raíces, promoviendo la actividad microbiana, pueden contribuir entre 0.2 a 4 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ a través de la fijación de nitrógeno bajo condiciones óptimas. Estas cifras se podrían aumentar a 20 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ si se optimizan las poblaciones microbiológicas (Jones *et al.* 2003). Otra asociación importante que ocurre en la rizósfera es la de rizobacterias promovedoras de crecimiento (PGPR-Plant growth promoting rhizobacteria).

3.2.2.3 Filósfera

Por analogía con la rizósfera de las raíces, se le ha llamado filósfera a la superficie externa de las hojas, que sirve como un ambiente para los microorganismos (Ruinen 1961). Los nutrientes exudados por las hojas y la humedad crean un ambiente ideal para la propagación de

microorganismos. A estos microorganismos que crecen en la filósfera se les conoce como epífilos o epífitas. Entre los epífilos que podemos encontrar hay una variedad de bacterias, algas verdes-azules (Cyanobacteria), líquenes, algas verdes, briofitas y hongos de los cuales algunos son capaces de fijar nitrógeno (Ruinen 1961, Ruinen 1974, Andrews e Hirano 1991).

El nitrógeno fijado por los epífilos se puede hacer disponible a otros organismos por lixiviación de compuestos nitrogenados de la cianobacteria viva. Parte de estos compuestos se pueden transferir directamente de los organismos en la filósfera a las hojas. Los compuestos fijados por los epífilos pueden formar parte del 25% del N en la hoja hospedera (Bentley y Carpenter 1984). El nitrógeno fijado también puede hacerse disponible a otros organismos después de la descomposición de las hojas caídas con epífilos (Freiberg 1998 citando a varios autores).

Algunos estudios indican que la fijación de nitrógeno por epífilos en algunos ecosistemas es una fuente importante de nitrógeno (Ruinen 1974). En un bosque lluvioso premontano en Costa Rica, la producción de nitrógeno en la filósfera puede ser de $1.6 \pm 0.8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Freiberg 1998). Sin embargo, en bosques tropicales de la India y en bosques templados se ha determinado que la fijación de nitrógeno en la filósfera no es significativa (Jones 1982; Gajendiran y Mahadevan 1989). Por otro lado, Roskoski (1980) en estudios realizados en México, encontró que la fijación de nitrógeno por epífilos en el ecosistema de café era baja, variando de $0.7 \text{ g N}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ a $1.4 \text{ g N}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

Se puede decir que un complejo apropiado de hojas y de asociaciones filoféricas bien establecida y balanceada puede ser responsable de las ganancias de nitrógeno en una vegetación. Además, los exudados de las hojas pueden servir como nutrientes adicionales para los microbios del suelo y pueden contribuir a la fijación no simbiótica de nitrógeno (Ruinen 1965).

3.2.3 Factores que afectan la Fijación Biológica de Nitrógeno

El contenido de N en el suelo y la hojarasca puede afectar la fijación de N_2 . Liengen y Olsen (1997) encontraron que la fijación de N por cianobacterias correlaciona positivamente con la relación C:N. La fijación biológica de N_2 es un proceso de alto costo energético,

especialmente para organismos heterótrofos de vida libre, los que además de fijar el N₂ de la atmósfera tienen que adoptar ciertos mecanismos para proteger a la nitrogenasa de desactivación (o desnaturalización) por el O₂. Si hay suficiente N en el suelo las bacterias no van a gastar energía en fijar N₂. Por lo tanto, a menor concentración de N mayor tasa de fijación (Vitousek y Hobbie 2000, Thompson y Vitousek 1997, Smith 1992).

Eisele *et al.* (1989) sugieren que la inhibición de fijación de N₂ por N combinado puede estar relacionada a la razón de N:P disponible. Diferentes estudios han encontrado que la adición de P al suelo estimula la fijación heterotrófica de N₂ (Crews *et al.* 2000, Vitousek y Hobbie 2000, Vitousek 1999). Reed *et al.* (2007) encontraron que la fertilización con P puede aumentar la disponibilidad de C en la hojarasca, lo que indirectamente estimula la fijación de N₂ de vida libre cambiando el ciclo de C. La fertilización con P puede también aumentar las concentraciones de otros nutrientes como Ca, Mg, K y Mo y aumentar el pH, lo que a su vez estimula la fijación de N₂ (Crews *et al.* 2000, Vitousek 1999). Varios autores han reportado el aumento en fijación de N₂ cuando se añade Mo (Vitousek 1999, Silvester 1989). Recientemente se ha encontrado que la falta de Mo solamente y no la adición de P puede limitar la fijación de nitrógeno por bacterias heterotróficas de vida libre (Barron *et al.* 2009).

3.3 Métodos para Medir Fijación Biológica de Nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es uno de los procesos naturales más importantes para añadir N a suelos agrícolas. Para obtener buenas prácticas de manejo es necesario cuantificar la cantidad de N que entra a los agrosistemas por medio de la fijación biológica. Para esto, se han desarrollado varios métodos o técnicas para medir la fijación biológica de nitrógeno en campo y laboratorio. Algunos de estos métodos incluyen la medición directa (¹⁵N) mientras otros miden indirectamente (C₂H₂) la fijación de nitrógeno. Ninguna técnica provee una medida precisa de fijación de nitrógeno para todas las leguminosas. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y desventajas. La selección del método va a depender de los objetivos que se quieran obtener. Se recomienda que siempre se utilicen diferentes métodos para tener un marco más amplio de interpretación de los resultados (Vera-Núñez *et al.* 2000).

3.3.1 Técnica de Reducción de Acetileno (ARA)

En esta técnica se utiliza el acetileno como sustrato de la enzima nitrogenasa. Ésta es capaz de reducir el acetileno ($\text{HC}\equiv\text{CH}$) a etileno (C_2H_4), de la misma forma que reduce el nitrógeno. El método consiste en incubar muestras de organismos fijadores en una atmósfera que contenga al menos 10 % de acetileno. El etileno que se produce después de un periodo de tiempo se mide por cromatografía de gas. Por lo tanto, se puede hacer una correlación entre la reducción de acetileno con la fijación de nitrógeno (Hardy *et al.* 1968). Para convertir las medidas de reducción de acetileno a valores absolutos de fijación de nitrógeno, el factor de conversión que más se utiliza es de 3 moles de N_2 por cada mol de acetileno reducido (Hardy *et al.* 1973).

Entre las desventajas de esta técnica está la naturaleza indirecta del método. Uno de los problemas es que el acetileno no es el sustrato natural de la nitrogenasa. El acetileno es más soluble en agua que el etileno y ambos son más solubles que el nitrógeno. Por lo tanto, es difícil asegurarse que el acetileno alcance todas las bacterias fijadoras o que el etileno se libere completamente de la muestra (Smith 1983). Además de que no se pueden hacer medidas por largos periodos de tiempo. Sólo se puede medir la actividad de la nitrogenasa por un corto período de tiempo, lo que requiere el uso de extrapolaciones (Unkovich y Pate 2000). Generalmente la exposición al C_2H_2 es de una hora, pero muchos ensayos necesitan más de pocas horas de exposición al C_2H_2 . En dichos ensayos es difícil controlar los cambios en poblaciones microbianas, concentración de nutrientes y concentración de gases atmosféricos, lo que puede hacer difícil la interpretación de los datos (Knowles 1980). Además, el factor de conversión de 3 no aplica en todos los casos ya que éste varía por sistema fijador, tasa de flujo de electrones, por el tiempo, irradiación y la temperatura. El factor de conversión verdadero puede variar ampliamente y puede ser entre 5-7.5 moles de C_2H_4 producidos por cada mol de N_2 fijado. Los problemas inherentes de esta y otras técnicas aumentan con actividades bajas de la nitrogenasa.

Una de las principales ventajas del ARA es la sensibilidad de la detección del etileno por ionización de llama. Esta sensibilidad hace posible el detectar niveles bajos de la actividad de fijación de nitrógeno. Además, este método es más sencillo, rápido, se pueden hacer mediciones

en el campo (Hardy *et al.* 1968) y es menos costoso (Unkovich y Pate 2000). Esta técnica se debe usar utilizar en conjunto con otras como ^{15}N para determinar el factor de conversión de cada sustrato (Nohrstedt 1983).

3.3.2 Dilución del isótopo ^{15}N

Esta técnica requiere la aplicación de fertilizantes enriquecidos con ^{15}N al suelo y la cosecha de la especie fijadora de N_2 y una planta no fijadora como referencia. Se analiza el contenido de ^{15}N de los residuos de las planta y se utiliza la dilución del fertilizante enriquecido con ^{15}N por el ^{14}N derivado del N_2 de la atmósfera relativo al de la planta no fijadora para calcular la proporción del N de la leguminosa proveniente del N_2 fijado de la atmósfera.

Las técnicas que utilizan ^{15}N pueden estimar el N fijado a través de una temporada o por periodos más largos de tiempo como también se pueden hacer estudios en el campo (Unkovich y Pate 2000). Es el único método que puede distinguir entre el N proveniente del suelo, del fertilizante y el N fijado de la FBN (Danso *et al.* 1986). A pesar de que esta técnica puede dar medidas muy precisas de la fijación de nitrógeno, existen problemas para asegurar que la tasa de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en la planta refleja la tasa integrada de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en el suelo que es variable en el tiempo y con la profundidad del suelo. Por lo tanto, es difícil obtener un estimado confiable del consumo de ^{15}N del suelo por las leguminosas usando una planta no fijadora de la misma u otra especie debido a las diferencias en el consumo de N mineral del suelo entre especies de plantas (Unkovich y Pate 2000). Otro problema de esta técnica, es que los errores son mayores a niveles de fijación bajos (Danso *et al.* 1993).

3.3.3 Abundancia Natural de ^{15}N o Método de $\delta^{15}\text{N}$

En la atmósfera se encuentran dos isótopos estables de nitrógeno, ^{14}N y ^{15}N . El ^{15}N se encuentra en la atmósfera a una abundancia de 0.3663% de átomos. En el suelo la abundancia de ^{15}N en el N mineral del suelo es un poco mayor, entre 0.368 y 0.373% átomos (Vera-Núñez *et al.* 2000). Se ha encontrado que las plantas fijadoras de N_2 tienen menor enriquecimiento de ^{15}N que

las plantas no fijadoras. Por lo tanto, se utiliza la extensión a la cual el ^{15}N (o $\delta^{15}\text{N}$) acumulado del suelo se diluye por el N_2 fijado en la planta fijadora para estimar la FBN.

La ventaja principal de este método es que no requiere la adición de ^{15}N . No envuelve la alteración del suelo como la incorporación de fertilizante de ^{15}N y por lo tanto, es más apropiado para ecosistemas naturales y plantaciones establecidas. Una desventaja es que a diferencia de los métodos de enriquecimiento de ^{15}N , puede haber errores significativos debido a que existe variabilidad entre diferentes partes de una planta (Shearer y Kohl 1986 citado por Danso et al 1992). El $\delta^{15}\text{N}$ de plantas no fijadoras creciendo en el mismo suelo puede variar por discriminación isotópica durante el consumo y asimilación de N (Giller 2001). Para disminuir estos errores se deben tomar varias plantas de referencia y sería necesario que éstas se encuentren cerca de la planta fijadora de N_2 (Giller 2001). Los errores pueden aumentar a medida que el enriquecimiento del suelo de ^{15}N se acerque al del aire. En algunos casos se ha encontrado valores bien negativos de ^{15}N en las plantas de referencia posiblemente por el ^{15}N reducido de la lluvia unido a salidas de N bien bajas (Vitousek *et al.* 1989). Por lo tanto, se deben identificar lugares donde sea posible tener diferencias en abundancia natural bien definidas (Vera-Núñez *et al.* 2000). Es preferible que el $\delta^{15}\text{N}$ del N del suelo disponible para la planta sea mayor de 6 ‰ (Peoples *et al.* 1989).

Los problemas en medir la fijación biológica de nitrógeno aumentan cuando se utilizan árboles. Las raíces de los árboles pueden penetrar muy profundo en el suelo; por lo que pueden tomar N del suelo de sumideros con cantidad de ^{15}N muy diferentes de los cuales las plantas de referencia obtienen su N, un hecho que introduce errores a los estimados de fijación de N_2 calculados usando el método de abundancia natural de ^{15}N (Mafongoya *et al.* 2004).

3.4 Secuestro de Carbono

3.4.1 Ciclo de Carbono

Actualmente la atmósfera está compuesta por 0.0380% de carbono en forma de CO_2 . Aunque es un porcentaje pequeño, todos los organismos están compuestos de carbono. Las

plantas obtienen el carbono de la atmósfera, el cual asimilan como polisacáridos, proteínas y grasa, almacenándolo en su tejido. Los demás organismos lo obtienen de las plantas, residuos u otros animales. Parte de este carbono se devuelve directamente en forma de CO_2 por las plantas y los animales como un subproducto de la respiración. El resto se incorpora en la biomasa viva.

El CO_2 entra a la atmósfera naturalmente por el proceso de los organismos de respiración y descomposición. Por medio de los procesos antropogénicos de quema de combustibles fósiles y deforestación se libera el carbono contenido en estos organismos en forma de CO_2 y metano (CH_4). El intercambio de CO_2 entre la tierra, océano y atmósfera (consumo por fotosíntesis y liberación por descomposición) está casi en equilibrio.

Las reservas más grandes de carbono son la atmósfera, los océanos, combustibles fósiles y ecosistemas terrestres, incluyendo vegetación y suelos. Aproximadamente 0.27% de la masa de elementos en la corteza terrestre es carbono y forma parte de 50% de la materia orgánica seca. La cantidad de carbono almacenada en la vegetación terrestre (550 ± 100 Pg) (1 Pg = 1 petagramo = 10^{15} g) es parecida a la cantidad en la atmósfera (800 Pg). La materia orgánica en los suelos es de dos a tres veces esta cantidad [1500–2000 PgC en el primer metro y hasta 2300 Pg en los primeros 3 m (Jobbágy y Jackson 2000)].

3.4.2 Efecto de Invernadero

El efecto de invernadero se define como el efecto que tienen los gases de invernadero (CO_2 , N_2O , CH_4 , entre otros) en la atmósfera, actuando como una capa protectora sobre la Tierra. Los gases de invernadero permiten la entrada a la atmósfera de radiación de largos de onda cortos pero absorben la radiación de largos de onda largos que sale y dirige alguna de esta a la Tierra (Smith 1996). La presencia natural de estos gases de invernadero es necesaria para mantener la temperatura de la Tierra. El problema surge con el aumento en la concentración de estos gases en la atmósfera. A medida que aumenta la concentración de los gases de invernadero queda atrapada mayor cantidad de calor. El efecto de invernadero significa que un aumento en la concentración de CO_2 resulta en un aumento en la temperatura de la biosfera. Por lo tanto, se espera que las emisiones continuas de CO_2 cambien el clima global.

La concentración de CO₂ en la atmósfera ha aumentado cerca de 100 ppm (36%), desde 1750 (era preindustrial) hasta el 2000 (IPCC 2007). El aumento en concentración de gases de invernadero se debe mayormente a la quema de combustibles fósiles, uso de tierras y cambios en el uso de tierra. La deforestación induce pérdidas de carbono del suelo y la vegetación. Aproximadamente se han liberado a la atmósfera 156 Pg de C por cambios en el uso de tierras, de esto aproximadamente el 60% proviene de los trópicos (Houghton 2003). Debido a que la secuestración de C terrestre es un proceso natural, esta es una de las posibles estrategias para reducir la tasa de enriquecimiento de CO₂ atmosférico.

3.4.3 Agroecosistemas para la secuestración de carbono

La deforestación y conversión de ecosistemas naturales a agrícolas reduce los sumideros de C. Cuando se cambian bosques tropicales a cultivos, las pérdidas de C orgánico del suelo a 1 m de profundidad pueden ser de 15 a 40 % en 2 a 3 años (Ingram y Fernandes 2001). La tasa de secuestración de C orgánico del suelo es de 100 a 1000 kg de C ha⁻¹ año⁻¹ y la secuestración potencial total en ecosistemas de bosques tropicales es de 200 a 500 Tg de C año⁻¹ (1 Teragramo = 1¹² g) de dos a cinco décadas. Por lo tanto, el sumidero de C orgánico del suelo se puede mejorar por medio de la restauración de suelos degradados y conversión a barbecho, agroforestería, plantaciones y pasturas mejoradas.

3.4.3.1 Bosques

Los bosques son importantes reservas de carbono ya que pueden almacenar entre 20 y 100 veces más carbono por hectárea que tierras agrícolas (Cairns y Meganck 1994). Se ha encontrado que los bosques tropicales húmedos pueden almacenar entre 155 y 187 ton de C ha⁻¹, mientras que los bosques secos pueden almacenar entre 27 y 63 ton de C ha⁻¹ (Brown y Lugo 1984) y bosques secundarios en Puerto Rico pueden almacenar en promedio 36.4 ton de C ha⁻¹ (Suárez-Rozo 2005). La acumulación de carbono en el ecosistema puede estar limitada por nutrientes, principalmente nitrógeno.

La biomasa acumulada de los bosques provee estimados del sumidero de carbono en la vegetación ya que cerca del 50% de esta es carbono. Por lo tanto, la biomasa representa la cantidad potencial de carbono que se puede añadir a la atmósfera como dióxido de carbono cuando el bosque se corta o se quema (Brown 1997).

3.4.3.2 Sistemas agroforestales

La agroforestería representa una interface entre agricultura y forestería y abarca prácticas de uso mixtas. Un sistema agroforestal se define como cualquier sistema de uso de tierras que envuelva la retención, introducción o combinación de árboles o arbustos perennes leñosos deliberadamente con cultivos agrícolas, pasturas y/o animales, tanto en combinación espacial o en secuencia temporal, para explotar las interacciones ecológicas y económicas de los diferentes componentes (Nair 1993). Estos sistemas no solo pueden crear sumideros de C en la forma de árboles y productos de madera sino que también pueden ayudar a prevenir que se reduzcan los sumideros de C actuales (Kürsten y Burschel 1993), disminuyendo así la deforestación y quema de árboles, causantes de la liberación de aproximadamente más de 1,000 toneladas de C ha⁻¹. El cultivo de café a sombra es uno de los sistemas agroforestales que se ha evaluado como sumidero de C.

3.4.3.2.1 Agrosistemas de café con sombra

Los sistemas agroforestales de café tienen la capacidad de almacenar carbono no sólo en la biomasa de las plantas de café sino también en la biomasa de los árboles de sombra y el suelo. Las plantas de café pueden secuestrar entre 4 a 10 ton de C ha⁻¹ (Vaast 2005), aunque varios estudios han reportado valores menores, entre 0.2 a 2.8 ton de C ha⁻¹ (Suárez Pascua 2002) y 1.4 a 3.5 ton de C ha⁻¹ (Polzot 2004).

La cantidad de carbono que pueden almacenar los árboles de sombra para el café es muy variable. Esta va a depender principalmente de las densidades de siembra, edad y especies; y del uso previo de la tierra (Vaast 2005). En agrosistemas de café con sombra de *Inga* sp. solamente el contenido de C en la biomasa puede variar de 1.9 a 17.5 ton de C ha⁻¹ (Polzot 2004, Suárez

Pascua 2002), mientras que en sistemas agroforestales con sombra diversificada los valores pueden llegar a 33.2 ton de C ha⁻¹ (Polzot 2004). Para *Cordia alliodora* se ha reportado una secuestración de C de 39 ton de C ha⁻¹, para *Terminalia amazonia* se estima en 32 ton de C ha⁻¹ y para *Eucalyptus deglupta* se ha promediado entre 14 a 17 ton de C ha⁻¹ (Vaast 2005). La hojarasca también puede aportar entre 1.22 ton de C ha⁻¹ en café a pleno sol a 4.23 ton de C ha⁻¹ bajo sombra de *E. deglupta* (Vaast 2005). En total los agrosistemas de café tienen la capacidad de secuestrar en su biomasa aérea de 11 a 73.3 ton de C ha⁻¹ (Ortiz-Ceballos 2004, Polzot 2004, Suárez-Pascua 2002, Alvarado *et al.* 1999, Kursten y Burschel 1993).

El carbono almacenado en el suelo puede aportar entre el 80 al 95.8 % del carbono total del sistema. En estos sistemas el secuestro de carbono en los suelos puede llegar a totalizar 220 ton de C ha⁻¹ (Vaast 2005). Se han encontrado valores de almacenamiento de C en diferentes sistemas agroforestales de café desde 102 a 188 ton de C ha⁻¹ (Mena-Mosquera 2008, Suárez-Pascua 2002, Ávila-Vargas 2000). El contenido de C en el suelo va a depender de las entradas orgánicas al suelo y de la tasa de descomposición (Albrecht *et al.* 2004).

Es importante conocer tanto el ciclo de C como el ciclo del N para evaluar los diferentes sistemas como sumideros de C. La disponibilidad de N en el suelo va a afectar la capacidad de los diferentes ecosistemas y agrosistemas para secuestrar C. En sitios con fijadores de nitrógeno, el sumidero de C normalmente es más alto que en bosques sin ellos, incluso si la productividad de la biomasa encima del suelo es más baja.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Se establecieron parcelas en tres localidades, Jayuya, Lares y Las Marías. En cada una de estas localidades se establecieron tres parcelas en los agrosistemas de café con sombra, café a sol y un bosque secundario. Cada parcela medía 20 m x 20 m. En el cuadro 1 se presentan las características de los ecosistemas bajo estudio. Estos agrosistemas se encuentran en la zona de vida de bosque muy húmedo subtropical (Holdridge 1996).

Tabla 1. Características de los ecosistemas bajo estudio

Localidad	Ecosistema	Latitud (Norte)	Longitud (Oeste)	Elevación (msnm)	Pendiente (%)	Precipitación media anual (mm)	Temp. media Anual (°C)
Jayuya	CSL	18°10'05"	66°37'50"	765	34	1935	22°
	CSM	18°09'41"	66°38'46"	785	41		
	BQS	18°09'44"	66°38'46"	817	31		
Lares	CSL	18°11'43"	66°50'55"	575	37	2494	24°
	CSM	18°11'59"	66°50'49"	636	35		
	BQS	18°11'46"	66°50'55"	605	74		
Las Marías	CSL	18°14'44"	67°00'25"	297	31	1876	25°
	CSM	18°14'39"	67°00'08"	288	20		
	BQS	18°14'43"	67°00'26"	285	3		

CSL: café al sol; CSM: café bajo sombra y BQS: bosque secundario; temp=temperatura. (Modificada de López 2008)

Los suelos de los agrosistemas bajo estudio fueron: un Oxisol de la serie Los Guineos (*very fine, kaolinick, isothermic, Humic Hapludox*) en Jayuya, un Inceptisol de la serie Anones (*fine, parasequic, isohyperthermic, Humic Drystrudeps*) en Lares y un Ultisol de la serie Humatas (*very fine, parasequic, isohyperthermic, Typic Haplohumults*) en Las Marías. La serie Los Guineos consiste de suelos profundos de desagüe moderadamente bueno. Según Arango (2007) la aptitud para el cultivo de café de esta serie es moderada. Las series Anones y Humatas consisten de suelos con buen desagüe, que son fuertemente ácidos y moderadamente permeables

(Soil Survey of Mayagüez Area y Beinroth *et al.* 2003). Arango (2007) clasifica la serie Anones como no óptima para el cultivo por su baja fertilidad y poca profundidad. Mientras que la serie Humatas está clasificada como óptima para el cultivo (Arango 2007). A pesar de las deficiencias en fertilidad, estos suelos son representativos de la región cafetalera de Puerto Rico.

La edad de las plantaciones de café se encuentra entre 8 y 15 años. Las variedades de café predominantes en las fincas son Caturra, Borbón y Limaní (López 2008). En la tabla 2 se presentan las densidades a las que está sembrado el café en cada agrosistema y localidad. Los árboles de sombra encontrados en los sistemas bajo estudio son mayormente *Inga sp.* aunque también se pueden encontrar cítricos, moca (*Andira inermis*) y otras especies en menor cantidad (Arango 2007). En las fincas se aplica fertilizante 12-5-15-3 de N, P₂O₅, K₂O, MgO + elementos menores de dos a tres veces al año, aproximadamente 28.3 gramos por planta (López 2008).

Las especies de árboles dominantes en el ecosistema de bosque son: Tulipán africano (*Spathodea campanulata*), Guaraguao (*Guarea guidonia*), Yagrumo macho (*Schefflera morototoni*), Pomarroza (*Syzigium jambos*) y Guaba (*Inga vera*). Estas especies son características de bosque secundario y éstos no son mayores de treinta años de edad. Además, en la localidad de Jayuya una de las especies dominantes fue la palma de sierra (*Prestoea montana*).

Tabla 2. Densidad de plantas de café por agrosistema en Jayuya, Lares y Las Marías

Localidad	Agrosistema	Densidad de plantas de café (plantas/ha)
Jayuya	Sol	4800
	Sombra	3050
Lares	Sol	2625
	Sombra	2317
Las Marías	Sol	3292
	Sombra	2900

4.1.1 Caracterización del área de estudio

4.1.1.1 Nivel de iluminación

Se utilizó un fotómetro para medir la iluminación en las parcelas bajo estudio. En cada parcela se tomaron 9 medidas con el fotómetro, 8 a 5 metros hacia adentro de la parcela y una en el centro. Se promediaron las 9 medidas para cada parcela.

4.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

Se midió la fijación de N_2 con la técnica de Reducción de Acetileno (ARA). Para esto se colectaron muestras de cada componente en frascos de 500 y 1000 ml herméticamente sellados con tapones serológicos en la tapa. Se tomaron muestras en todas las localidades una vez al mes por seis meses. A estas muestras se les inyectó 10 % del volumen de los frascos de acetileno (C_2H_2) de alta pureza. Después de aplicar el acetileno, se dejaron incubando de 1 a 3 horas. Luego se tomaron dos muestras del gas contenido en los frascos con jeringas de 1 ml, las cuales se almacenaron en tapones de goma, y se analizaron las muestras para determinar la concentración de etileno (C_2H_4) en un cromatógrafo de gases Agilent 6850 con detector de ionización de llama de H_2 ($200^\circ C$) (Hardy *et al.* 1968 y 1973) y una columna empacada de acero Poropak R (malla de 100 a 200). Se utilizó el factor de conversión de 3 moles de N_2 por cada mol de C_2H_4 producido, determinado por Hardy *et al.* (1968). Posteriormente realizada la conversión, se calcularon los mg o μg de N producidos durante una hora, estos valores se multiplicaron por 24 para obtener la cantidad de N producido por día y luego se multiplicaron por 30 para obtener la fijación de N mensual. Se promediaron los valores de cada muestreo para obtener la fijación promedio mensual. Luego se obtuvo la fijación de N promedio por el periodo de seis meses, con el promedio de la fijación promedio mensual. Se extrapoló la fijación promedio por periodo a año multiplicando por dos para poder comparar con otros estudios.

4.2.1 Fijación de nitrógeno en hojarasca

Se recolectaron tres muestras de hojarasca en frascos de 500 ml por parcela, una vez al mes por seis meses. A dos muestras se les inyectó 50 cc de acetileno (C_2H_2) y la tercera se utilizó como control del etileno que se produce sin acetileno (Reed *et al.* 2007). Las dos medidas de cada parcela se promediaron para obtener una medida de cada parcela. Las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente por tres horas. Este es el periodo mínimo de incubación que se necesita para reducir suficiente etileno para una detección clara y fuerte (Crews *et al.* 2000). Luego de las tres horas se sacaron dos muestras de 1 cc del gas contenido en el frasco y se midió la concentración de etileno (C_2H_4) utilizando un cromatógrafo de gas. A estas muestras se les restó la concentración de C_2H_4 del control sin C_2H_2 . Las muestras de hojarasca se secaron y se pesaron para expresar la fijación de N en μg de N g de peso seco⁻¹. El área del frasco, 0.0452 m², se utilizó para estimar la fijación de N por hectárea. Se transformaron los datos con raíz cuadrada para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

4.2.2 Fijación de nitrógeno en filósfera de plantas de café

Adaptando el método utilizado por Roskoski (1980), se tomaron 20 hojas de café, dos de cada 10 árboles escogidos al azar en cada parcela, una vez al mes por ocho meses. Diez de estas hojas se colocaron en frascos plásticos herméticamente sellados de 500 ml y se les inyectó 50 cc de C_2H_2 . Las otras diez hojas se utilizaron como control colocándolas en otro frasco plástico de 500 ml sin inyectarle C_2H_2 . Estas muestras se incubaron por tres horas a temperatura ambiente y se sacaron dos muestras de 1 cc del gas contenido en el frasco con una jeringa. De estas muestras se midió la concentración de C_2H_4 utilizando un cromatógrafo de gases. A esto se le restó la concentración de C_2H_4 del control sin C_2H_2 . Se convirtieron los moles de C_2H_4 producido a moles de N_2 fijado, utilizando el factor de conversión teórico de 3 (Hardy *et al.* 1968). Las hojas se secaron y se pesaron para expresar la cantidad de N_2 fijado en μg de N g de peso seco⁻¹. Se contabilizó la cantidad de hojas en 10 plantas de café escogidas al azar y multiplicando esta cantidad por la densidad de plantas se calculó la cantidad de N_2 fijado por unidad de área.

4.2.3 Fijación de nitrógeno en líquenes

Se tomaron 2 muestras de corteza de plantas de café (en el agrosistema de café) y de árboles (en bosque) con líquenes de aproximadamente 3 cm x 3 cm en cada parcela mensualmente por seis meses. Estas se colocaron en frascos plásticos de 500 ml. A uno de los frascos se le inyectó 50 cc de C_2H_2 de alta pureza y el otro se utilizó como control, sin inyectarle C_2H_2 . Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por tres horas. Se sacaron dos muestras de 1 cc del gas contenido en el frasco con una jeringa. A estas muestras se les midió la concentración de C_2H_4 utilizando un cromatógrafo de gas. Se les restó la concentración de C_2H_4 del control sin C_2H_2 . Se utilizó el factor de conversión teórico de 3 moles de N_2 fijado por cada mol de C_2H_4 producido (Hardy *et. al.* 1968). Los líquenes se secaron y se pesaron para expresar la cantidad de N_2 fijado en μg de N g de peso seco⁻¹. En los agrosistemas de café, se escogieron 10 plantas de café al azar para medir el área cubierta por líquenes. Luego ésta se multiplicó por la densidad de plantas para expresar el nitrógeno fijado en base a área. En el ecosistema de bosque, se escogieron 10 árboles al azar a los que se les midió el área cubierta por líquenes hasta 1.8 metros de altura. El área cubierta por líquenes se multiplicó por la altura de cada árbol, se calculó un promedio por árbol y multiplicando por la densidad de árboles se obtuvo el nitrógeno fijado por unidad de área de líquen.

4.2.4 Fijación de nitrógeno en suelo

Se recogieron muestras de suelo a 20 cm de profundidad mensualmente por seis meses. En el bosque se tomaron 3 muestras al azar en cada parcela. En el agrosistema de café a sol se tomaron 3 muestras de suelo a 0.5 m de distancia del tronco de un arbusto de café escogido al azar. Igualmente, en el agrosistema de café con sombra se escogió una planta de café a menos de 4 metros de un árbol de *Inga vera* y se tomaron 3 muestras de suelo a 0.5 m de distancia del tronco. Además, se escogió al azar un árbol de *Inga vera* y se tomaron 3 muestras de suelo a un radio de 0.5 m y 3 muestras a un radio de 1.2 m de distancia del tronco (Roskoski 1981).

Estas muestras se colocaron en frascos plásticos de 1000 ml herméticamente sellados con tapones serológicos en la tapa. Estos frascos se inyectaron con 100 cc de acetileno (C_2H_2) de alta

pureza. Se dejaron incubando las muestras a temperatura ambiente por una hora. Luego se sacaron dos muestras de 1cc del gas contenido en el frasco con una jeringa y se analizaron con un cromatógrafo de gases. Se midió la concentración de C_2H_4 y se les restó la concentración de C_2H_4 del control sin C_2H_2 . Se utilizó el factor de conversión teórico de 3 moles de N_2 fijado por cada mol de C_2H_4 producido (Hardy *et al.* 1968). Las muestras de suelo se secaron y se pesaron para expresar la cantidad de nitrógeno fijado como μg de N gramo de peso seco⁻¹ año⁻¹ y con el peso de 1 hectárea (1,800,000 kg de suelo) se estimó g de N_2 ha⁻¹ año⁻¹.

La cantidad total de N fijado por hectárea en el suelo alrededor de los árboles de *Inga* se calculó con la densidad de árboles de *Inga* en el área de estudio. En Jayuya se encontraron 11 árboles de *Inga vera* en total (275 árboles *Inga* ha⁻¹), en Lares se contabilizaron 18 *Inga* (450 árboles *Inga* ha⁻¹) y en Las Marías el total para las tres parcelas fue de 16 *Inga* (400 árboles *Inga* ha⁻¹). El área a 0.5 y 1.2 metros de los árboles de *Inga* se calculó con la fórmula de área de un anillo. El diámetro del círculo interior (r) se tomó del promedio del diámetro a la altura del pecho de los árboles.

$$A = \pi (R^2 - r^2) \quad [1]$$

4.3 Contenido de nitrógeno en café

Se tomaron 10 hojas de cada parcela en los agrosistemas de café para determinar el contenido de N total. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Central Analítico de la Estación Experimental Agrícola en Río Piedras donde se utilizó el método de Kjeldahl. Con los valores de biomasa total aérea y estimados del porcentaje que ocupan las hojas de café en la biomasa por estudios realizados por Alpizar *et al.* (1985), Aranguren *et al.* (1982), Quintero y Ataroff (1998) y Dossa *et al.* (2008) se determinó el contenido de nitrógeno en la biomasa de las hojas en kg ha⁻¹.

4.3.1 Contenido de ^{15}N en agrosistemas de café en Las Marías

Se tomaron diez hojas de café en una parcela de cada uno de los sistemas de café a pleno sol y café con sombra en Las Marías. Se tomó una rama del árbol de sombra, *Inga vera*, en la parcela del sistema de café con sombra. Como árbol de referencia se utilizó *Guarea guidonia* (guaraguao) localizado en el sistema de bosque y se tomó una rama. Las muestras de hojas de cada planta fueron enviadas a la Universidad de Illinois en Chicago para análisis de composición isotópica.

4.4 Estimación de biomasa aérea y secuestro de carbono

4.4.1 Árboles de sombra en café

Se midió la altura y el diámetro a la altura del pecho (DAP) de todos los árboles de sombra en cada parcela. Se utilizó la ecuación de regresión lineal creada para árboles de sombra de café en Nicaragua (Segura *et al.* 2006).

$$\text{Log}_{10}\mathbf{B}_T = - 0.834 + 2.223 * \text{Log}_{10}\mathbf{D}_{BH} \quad [2]$$

Donde

\mathbf{B}_T = Biomasa total (kg/árbol)

\mathbf{D}_{BH} = Diámetro a la altura del pecho 1.4 m

4.4.2 Plantas de café

Se escogieron 10 plantas al azar en una línea diagonal de cada parcela. A estas plantas se les midió la altura y el diámetro a 15 cm del suelo. Se utilizó la ecuación de regresión lineal creada para estimar biomasa aérea total en plantas de café en sistemas agroforestales (Segura *et al.* 2006).

$$\text{Log}_{10}(\mathbf{B}_T) = - 1.113 + 1.578 * \text{Log}_{10}(\mathbf{d}_{15}) + 0.581 * \text{Log}_{10}(\mathbf{h}) \quad [3]$$

Donde

\mathbf{B}_T = Biomasa total aérea (kg/planta)

d_{15} = Diámetro a 15 cm del suelo (cm)

h = Altura total en metros

4.4.3 Árboles en bosque secundario

Se midió la altura y el DAP de todos los árboles en las parcelas de bosque en las tres localidades. Se calculó la biomasa de árboles utilizando la ecuación de regresión para bosque muy húmedo subtropical de Scatena *et al.* (1993).

$$B_T = \exp \{0.950 \ln (D_{BH}^2 H_t) - 3.282\} \quad [4]$$

Donde

B_T = Biomasa total (kg/árbol)

D_{BH} = Diámetro a la altura del pecho 1.4 m (cm)

H_t = Altura total en metros

Para estimar la biomasa de la palma de sierra (*Prestoea montana*) en el bosque de Jayuya se utilizó la ecuación de Frangi y Lugo (1985).

$$B_T = 10.0 + 6.4 (H_t) \quad [5]$$

Donde

H_t = Altura total en metros

Se determinó el almacenamiento de carbono multiplicando el total de la biomasa aérea (ton/ha) por 0.5 (Odum 1971). Para calcular el carbono en el suelo se utilizó el análisis de suelo realizado por López (2008) en las mismas parcelas.

4.4.4 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Infostat 2008 para realizar los análisis estadísticos. Los datos de hojarasca se transformaron con raíz cuadrada y los de líquen y suelo se transformaron

logarítmicamente para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Se analizaron los datos por medio de ANOVA y se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para encontrar diferencias significativas. Se hicieron los análisis para cada localidad como un diseño completamente aleatorizado.

5 RESULTADOS

5.1 Área de Estudio

5.1.1 Caracterización del área de estudio

5.1.1.1 Nivel de iluminación

El nivel de iluminación en los sistemas bajo estudio varió de 33,307 a 66,784 lux en el agrosistema de café a pleno sol (Tabla 3). En los sistemas de café con sombra y bosque se obtuvo menor cantidad de iluminación. En el sistema de sombra la iluminación varió de 2,208 a 6,797 lux y en el bosque de 998 a 2,208 lux.

Tabla 3. Nivel de iluminación en café a sol, café con sombra y bosque en cada localidad.^a

Localidad	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Jayuya	49,041 (6,114)	6,797 (1,679)	998 (250)
Lares	66,784 (21,309)	4,304 (1,444)	2,177 (1,102)
Las Marías	33,307 (5,244)	3,533 (864)	2,208 (408)
Promedio	49,711	4,878	1,794

^aValores expresados en lux con errores estándar en paréntesis.

5.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

5.2.1 Fijación de nitrógeno en hojarasca

La fijación de N₂ en la hojarasca de las tres localidades fue consistentemente mayor en el bosque que en los agrosistemas de café (Figura 2). En la localidad de Jayuya se encontró cerca de tres veces mayor fijación de N₂ en el sistema de bosque (112.07 mg de N hectárea⁻¹ período⁻¹) que en los agrosistemas de café a sol (38.14 mg de N hectárea⁻¹ período⁻¹) y con sombra (38.29 mg de N hectárea⁻¹ período⁻¹). En la localidad de Lares se encontró 1.5 veces más fijación de N₂

en el bosque (51.06 mg de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹) que en el café a sol (35.08 mg de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹) y cerca de dos veces más que en el café con sombra (26.63 mg de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹). En Las Marías no hubo diferencias significativas entre el sistema de bosque y el café a sol, ambos con mayor fijación que el agrosistema de café con sombra.

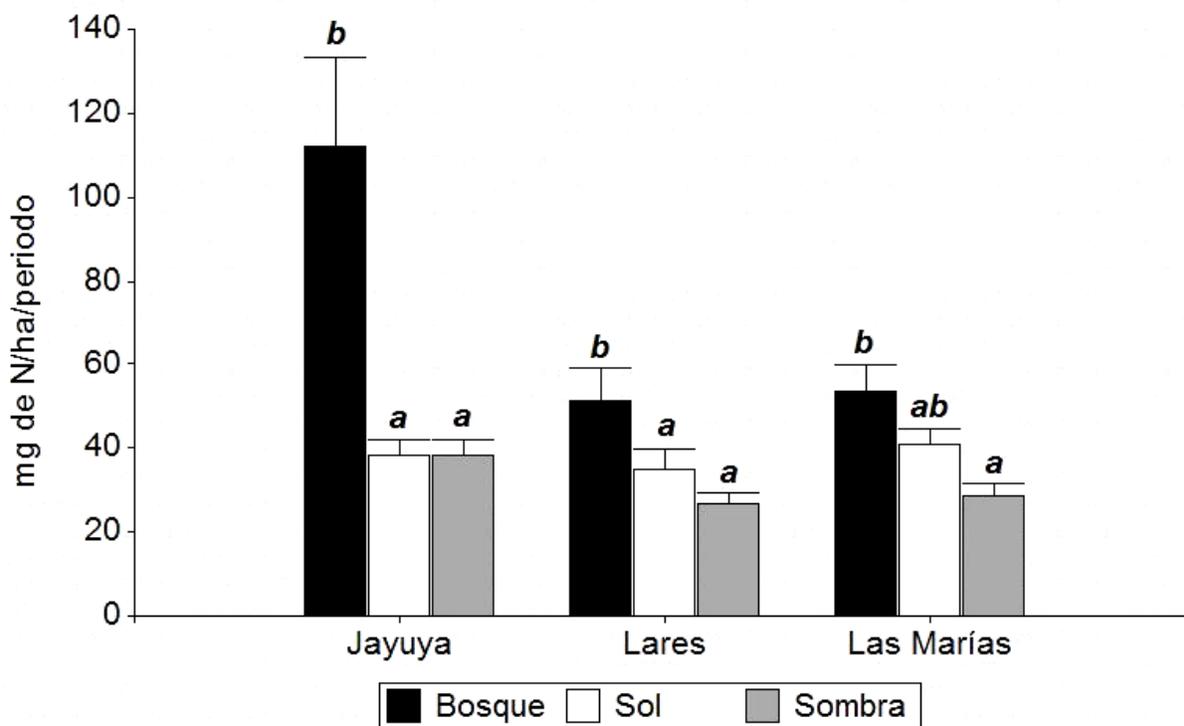


Figura 2. Fijación promedio de N₂ en hojarasca por ecosistema en las tres localidades (mg de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹)

En la localidad de Jayuya la fijación de N₂ en el agrosistema de café a sol, varió de 0.014 a 0.022 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ (Tabla 4). En este agrosistema no hubo diferencias significativas en la fijación de N₂ entre los meses. En promedio, se fijaron 0.019 μ g de N₂ g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en la hojarasca del café a pleno sol. En el agrosistema de café bajo sombra la fijación de N₂ en la hojarasca varió de 0.009 a 0.038 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹. En este agrosistema se obtuvo menor fijación de N₂ en los meses de mayo y agosto (0.009 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹) pero ésta sólo fue significativamente diferente a la fijación encontrada para el mes de abril (Tabla 4). La fijación de N₂ en el sistema de bosque varió de 0.020 a 0.129 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹. En este sistema se encontró

significativamente mayor fijación de N₂ en el mes de septiembre. En estos meses se reportó mayor precipitación que los meses anteriores. En promedio, en el sistema de bosque se encontró mayor fijación de N₂ por mes que en los sistemas de café a sol y con sombra.

Tabla 4. Fijación promedio mensual de N₂ en hojarasca por ecosistema en la localidad de Jayuya.^a

Mes	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	0.021 (0.005) a	0.038 (0.006) b	0.033 (0.008) a
Mayo	0.014 (0.004) a	0.009 (0.003) a	0.020 (0.005) a
Junio	0.022 (0.006) a	0.027 (0.006) ab	0.024 (0.005) a
Julio	0.022 (0.004) a	0.017 (0.005) ab	0.042 (0.022) a
Agosto	0.017 (0.004) a	0.009 (0.004) a	0.054 (0.011) ab
Septiembre	0.019 (0.003) a	0.024 (0.004) ab	0.129 (0.039) b
Promedio	0.019	0.021	0.051

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En la tabla 5 se presenta la fijación de N₂ obtenida en la localidad de Lares en base a gramos de peso seco de hojarasca. En esta localidad no se encontraron diferencias significativas en fijación de N₂ por mes en los sistemas de café a sol y bosque. En el sistema de café con sombra sólo se encontró significativamente mayor fijación de N₂ en el mes de junio.

Tabla 5. Fijación promedio mensual de N₂ en hojarasca por ecosistema en la localidad de Lares.^a

Mes	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	0.026 (0.010) a	0.012 (0.004) a	0.020 (0.008) a
Mayo	0.017 (0.006) a	0.010 (0.002) a	0.015 (0.003) a
Junio	0.016 (0.004) a	0.034 (0.007) b	0.039 (0.014) a
Julio	0.026 (0.006) a	0.006 (0.002) a	0.016 (0.004) a
Agosto	0.014 (0.003) a	0.012 (0.002) a	0.030 (0.011) a
Septiembre	0.017 (0.007) a	0.011 (0.003) a	0.019 (0.004) a
Promedio	0.019	0.014	0.023

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En la localidad de Las Marías en los sistemas de café con sombra y bosque no se encontraron diferencias significativas entre los meses. Sin embargo, en el sistema de café a pleno sol hubo menor fijación de N₂ en los meses de abril y agosto (0.010 μgramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹) aunque ésta sólo fue significativamente diferente a la fijación obtenida en el mes de mayo (Tabla 6). En estos meses no hubo diferencias significativas en la precipitación. Por lo tanto, se presume que existen otros factores no influenciados directamente por la humedad que controlan la fijación de N₂ en la hojarasca (Reed *et al.*2007).

Tabla 6. Fijación promedio mensual de N₂ en hojarasca por ecosistema en la localidad de Las Marías.^a

Mes	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	0.010 (0.001) a	0.016 (0.005) a	0.022 (0.005) a
Mayo	0.034 (0.009) b	0.019 (0.005) a	0.022 (0.008) a
Junio	0.031 (0.011) ab	0.020 (0.006) a	0.050 (0.007) a
Julio	0.015 (0.002) ab	0.014 (0.004) a	0.032 (0.011) a
Agosto	0.010 (0.002) a	0.010 (0.003) a	0.015 (0.003) a
Septiembre	0.030 (0.005) ab	0.014 (0.005) a	0.029 (0.010) a
Promedio	0.022	0.015	0.027

^aValores expresados en μgramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

5.2.2 Fijación de nitrógeno en la filósfera de plantas de café

La fijación de N₂ en la filósfera de las plantas de café varió de 0.049 a 0.086 μgramos de N g de peso seco⁻¹ periodo⁻¹ (Tabla 7). No se encontraron diferencias significativas en ésta entre los agrosistemas de café a pleno sol y con sombra en las tres localidades.

Tabla 7. Fijación promedio de N₂ en hojas de café por ecosistema en cada localidad.^a

Sistema	Jayuya	Lares	Las Marías
Sol	0.067 (0.010) a	0.053 (0.007) a	0.080 (0.010) a
Sombra	0.049 (0.007) a	0.072 (0.008) a	0.086 (0.008) a
Promedio	0.058	0.063	0.083

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/periodo con errores estándar en paréntesis.

En la localidad de Jayuya, la fijación de N₂ en la filósfera de las plantas de café varió de 0.020 a 0.149 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el sistema de café a sol y de 0.010 a 0.080 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema con sombra (Tabla 8). En el agrosistema con sombra no se encontraron diferencias significativas en la fijación de N entre los meses. Sin embargo, en el agrosistema a pleno sol se encontró significativamente mayor fijación de N en el mes de febrero que en los meses de junio y septiembre.

Tabla 8. Fijación promedio mensual de N₂ en hojas de café por ecosistema en la localidad de Jayuya.^a

Mes	Ecosistema	
	Sol	Sombra
Enero	0.109 (0.043) ab	0.022 (0.011) a
Febrero	0.149 (0.024) b	0.010 (0.009) a
Abril	0.058 (0.013) ab	0.052 (0.006) a
Mayo	0.062 (0.009) ab	0.048 (0.009) a
Junio	0.020 (0.020) a	0.080 (0.040) a
Julio	0.080 (0.028) ab	0.065 (0.010) a
Agosto	0.072 (0.004) ab	0.039 (0.002) a
Septiembre	0.032 (0.003) a	0.070 (0.012) a
Promedio	0.073	0.048

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis.

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

La fijación de N₂ en la localidad de Lares varió de 0.020 a 0.073 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café a sol y de 0.043 a 0.128 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café con sombra (Tabla 9). No se encontraron diferencias significativas entre los meses en ninguno de los agrosistemas.

Tabla 9. Fijación promedio mensual de N₂ en hojas de café por ecosistema en la localidad de Lares.^a

Mes	Ecosistema	
	Sol	Sombra
Enero	0.064 (0.020) a	0.066 (0.033) a
Febrero	0.029 (0.004) a	0.083 (0.027) a
Abril	0.020 (0.010) a	0.050 (0.006) a
Mayo	0.049 (0.016) a	0.063 (0.005) a
Junio	0.066 (0.009) a	0.128 (0.033) a
Julio	0.068 (0.016) a	0.067 (0.009) a
Agosto	0.073 (0.039) a	0.071 (0.010) a
Septiembre	0.051 (0.008) a	0.043 (0.002) a
Promedio	0.053	0.072

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis.

En la localidad de Las Marías, la fijación de N₂ en el agrosistema de café a sol varió de 0.052 a 0.137 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ (Tabla 10). En el agrosistema de café con sombra la fijación de N₂ varió de 0.057 a 0.131 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹. Al igual que en Lares, no se encontraron diferencias significativas entre los meses.

Tabla 10. Fijación promedio mensual de N₂ en hojas de café por ecosistema en la localidad de Las Marías.^a

Mes	Ecosistema	
	Sol	Sombra
Enero	0.090 (0.070) a	0.064 (0.032) a

Febrero	0.070 (0.022) a	0.078 (0.016) a
Abril	0.093 (0.027) a	0.057 (0.015) a
Mayo	0.137 (0.021) a	0.086 (0.003) a
Junio	0.061 (0.014) a	0.089 (0.037) a
Julio	0.052 (0.028) a	0.131 (0.020) a
Agosto	0.083 (0.014) a	0.111 (0.017) a
Septiembre	0.063 (0.014) a	0.064 (0.008) a
Promedio	0.081	0.085

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis.

En esta localidad se calculó la fijación de N_2 por hectárea la cual resultó ser 0.2 g de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹ en el café a sol y 0.06 g de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹ en el café con sombra. En este caso se observan diferencias significativas entre sistemas debido a la diferencia en densidad de plantas. A mayor área de hojas con microorganismos fijadores mayor cantidad de nitrógeno entra al sistema.

5.2.3 Fijación de nitrógeno en líquenes

En la fijación de N_2 promedio anual calculada para líquenes no se encontraron diferencias significativas entre los ecosistemas en ninguna de las localidades. Esta varió de 17.15 a 64.09 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ año⁻¹ en la localidad de Jayuya (Tabla 11). En la localidad de Lares varió de 23.13 a 30.04 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ año⁻¹ y en Las Marías de 18.88 a 31.72 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ año⁻¹. Sin embargo, los valores encontrados en los sistemas de café a sol son mayores en todas las localidades.

Tabla 11. Fijación promedio de N_2 calculada en líquenes por ecosistema en las tres localidades.^a

Ecosistema	Jayuya	Lares	Las Marías
Sol	5.27 (2.38) a	2.47 (0.55) a	2.61 (0.56) a
Sombra	3.77 (1.08) a	2.24 (0.71) a	1.55 (0.31) a
Bosque	1.41 (0.26) a	1.90 (0.38) a	1.90 (0.41) a

Promedio	3.39	2.20	2.02
-----------------	------	------	------

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/periodo con errores estándar en paréntesis.

La fijación de N_2 por líquenes en la localidad de Jayuya varió de 0.48 a 15.10 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café a sol (Tabla 12). En el agrosistema de café con sombra la fijación de N_2 varió de 0.57 a 7.35 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ y en el bosque de 0.51 a 3.14 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹. No se encontraron diferencias significativas entre los meses en ninguno de los tres ecosistemas.

Tabla 12. Fijación promedio mensual de N_2 en líquenes por ecosistema en la localidad de Jayuya.^a

Mes	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	2.83 (0.99) a	2.77 (1.29) a	1.39 (0.53) a
Mayo	5.18 (0.67) a	7.35 (3.64) a	3.14 (0.51) a
Junio	0.62 (0.46) a	1.51 (0.37) a	0.51 (0.11) a
Julio	7.05 (4.70) a	3.36 (0.94) a	1.36 (0.50) a
Agosto	15.10 (13.83) a	7.08 (4.78) a	0.72 (0.32) a
Septiembre	0.83 (0.13) a	0.57 (0.04) a	1.35 (0.72) a
Promedio	5.24	3.77	1.41

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis.

En la localidad de Lares, la fijación de N_2 varió de 1.05 a 4.61 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café a sol (Tabla 13). Mientras que en los ecosistemas de café con sombra y bosque la fijación promedio varió de 0.98 a 6.75 y de 0.97 a 3.53 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ respectivamente. En esta localidad tampoco se encontraron diferencias significativas en la fijación promedio mensual ni hubo diferencias significativas entre los ecosistemas.

Tabla 13. Fijación promedio mensual de N_2 en líquenes por ecosistema en la localidad de Lares.^a

Mes	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	1.95 (1.13) a	1.57 (0.93) a	0.97 (0.32) a
Mayo	1.05 (0.37) a	1.19 (0.31) a	2.05 (0.95) a

Junio	1.18 (0.36) a	1.70 (0.70) a	1.27 (0.08) a
Julio	4.03 (0.54) a	0.98 (0.17) a	1.30 (0.47) a
Agosto	4.61 (2.69) a	6.75 (3.45) a	3.53 (1.35) a
Septiembre	1.99 (0.99) a	1.26 (0.18) a	2.28 (1.42) a
Promedio	2.46	2.24	1.90

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis.

La fijación promedio de N_2 por líquenes en la localidad de Las Marías varió de 1.21 a 5.29 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café a sol (Tabla 14). En este sistema no se encontraron diferencias significativas entre los meses. En el agrosistema de café con sombra la fijación de N_2 varió de 0.66 a 2.29 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹ y no se encontraron diferencias significativas entre los meses. En el sistema de bosque tampoco se encontraron diferencias significativas en la fijación entre los meses y ésta varió de 0.93 a 3.07 μ gramos de N g de peso seco⁻¹ mes⁻¹.

Tabla 14. Fijación promedio mensual de N_2 en líquenes por ecosistema en la localidad de Las Marías.^a

Mes	Ecosistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	2.05 (0.59) a	2.18 (1.24) a	2.53 (1.15) a
Mayo	2.59 (1.32) a	1.78 (0.68) a	1.07 (0.17) a
Junio	1.21 (0.84) a	0.88 (0.26) a	2.65 (0.50) a
Julio	1.45 (0.27) a	1.53 (0.39) a	0.93 (0.13) a
Agosto	3.06 (1.81) a	2.29 (1.20) a	1.15 (0.10) a
Septiembre	5.29 (2.12) a	0.66 (0.17) a	3.07 (2.18) a
Promedio	2.61	1.55	1.90

^aValores expresados en μ gramos de N/g de peso seco/mes con errores estándar en paréntesis.

En la localidad de Las Marías, se calculó la fijación de N_2 por hectárea y se encontró que en el bosque se puede fijar significativamente más N_2 que en los agrosistemas de café, posiblemente por la mayor densidad de líquenes en el bosque. En este ecosistema se fijaron 0.069 mg de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹, mientras que en los ecosistemas de café a sol y con sombra se fijaron 0.019 y 0.014 mg de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹ respectivamente.

5.2.4 Fijación de nitrógeno en suelo

5.2.4.1 Suelo de plantas de café

En la figura 3 se presenta la fijación de N_2 promedio por el periodo de seis meses por ecosistema en las tres localidades estudiadas. En las localidades de Jayuya y Las Marías se pudieron observar las mismas tendencias en fijación de N_2 , significativamente mayor fijación de N_2 en el suelo del agrosistema de café con sombra que en el sistema de café a sol. En Jayuya se fijó dos veces más N_2 en el agrosistema de café con sombra ($22.56 \text{ g de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$) que en el café a sol ($11.07 \text{ g de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$). De igual forma, en Las Marías se fijó cerca del doble de N_2 en el agrosistema de café con sombra ($27.23 \text{ g de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$) que en el café a pleno sol ($14.29 \text{ g de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$). En esta localidad no hubo diferencias significativas entre la fijación de N_2 encontrada en el bosque ($18.92 \text{ g de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$) y la fijación en los agrosistemas de café. En la localidad de Lares, la fijación promedio de N_2 en el suelo varió de 13.32 (café con sombra) a $14.98 \text{ g de N ha}^{-1} \text{ periodo}^{-1}$ (café a sol) sin encontrarse diferencias significativas.

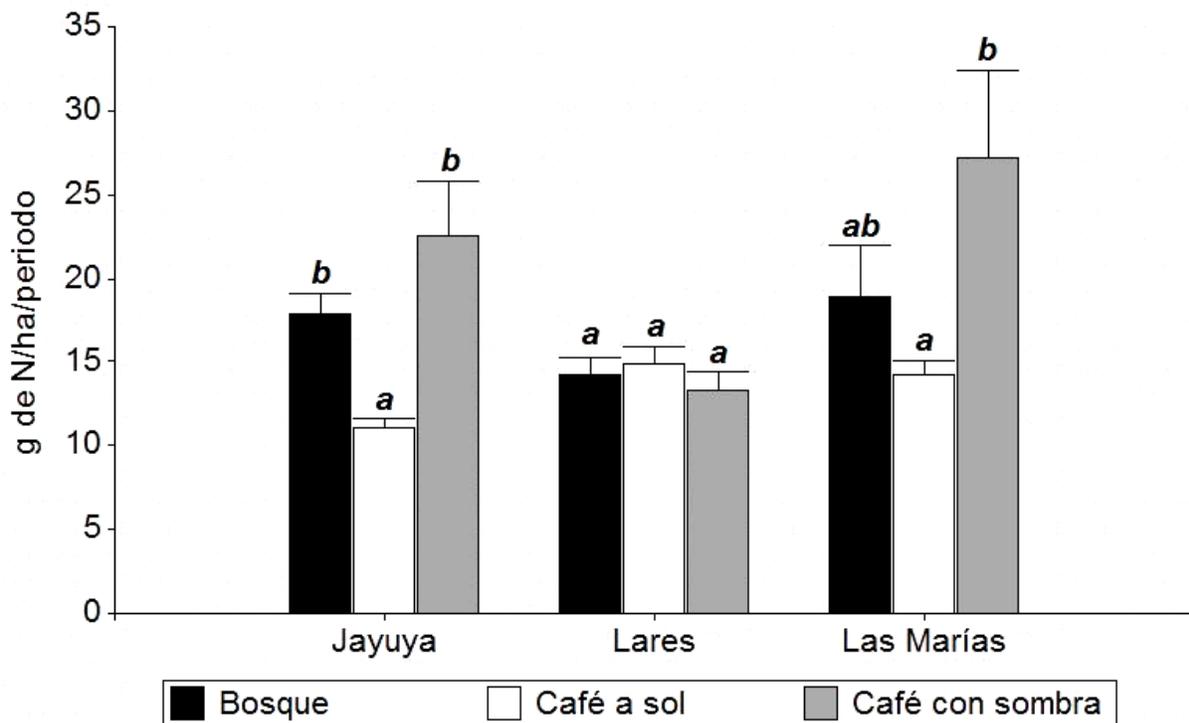


Figura 3. Fijación promedio de N₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en cada localidad (g de N hectárea⁻¹ periodo⁻¹)

La fijación de N₂ en el suelo en la localidad de Jayuya varió de 9.01 a 12.58 g de N ha⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café a sol (Tabla 15). En el agrosistema de café con sombra la fijación varió de 14.31 a 41.72 g de N ha⁻¹ mes⁻¹. En estos dos agrosistemas la fijación de N₂ no fue significativamente diferente entre los meses. En cambio, en el ecosistema de bosque se encontraron diferencias significativas. La fijación de N₂ en el bosque varió de 7.80 a 26.60 g de N ha⁻¹ mes⁻¹, donde la menor cantidad de N₂ fijado se encontró en el mes de junio y la mayor en abril. En promedio, se encontró significativamente mayor fijación de N₂ en los ecosistemas de café con sombra y bosque que en el sistema de café a sol.

Tabla 15. Fijación promedio mensual de N₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en la localidad de Jayuya.^a

Mes	Sistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	12.24 (1.38) a	14.31 (3.12) a	26.60 (2.59) d
Mayo	10.63 (0.85) a	19.09 (3.46) a	12.94 (1.46) ab
Junio	12.58 (1.54) a	41.72 (18.07) a	7.80 (1.64) a
Julio	11.23 (1.02) a	18.83 (1.42) a	15.61 (1.54) bc
Agosto	9.01 (1.54) a	24.62 (2.48) a	22.56 (2.98) cd
Septiembre	10.74 (0.87) a	16.82 (2.75) a	21.89 (2.02) cd
Promedio	11.07	22.56	17.90

^aValores expresados en gramos de N/hectárea/mes con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p <= 0.05$)

En la localidad de Lares, la fijación de N₂ en el suelo varió de 10.61 a 18.19 g de N ha⁻¹ mes⁻¹ en el agrosistema de café a pleno sol (Tabla 16). En el agrosistema de café con sombra la fijación varió de 7.94 a 18.37 y en el bosque de 10.54 a 17.39 g de N ha⁻¹ mes⁻¹. En el sistema de café con sombra se encontraron diferencias significativas. En el mes de abril se obtuvo la menor

fijación de N₂ mientras que en el mes de julio se encontró la mayor. En los ecosistemas de café a sol y bosque no se encontraron diferencias significativas entre los meses. En esta localidad a diferencia de las otras dos localidades no se encontraron diferencias significativas entre los ecosistemas.

Tabla 16. Fijación promedio mensual de N₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en la localidad en Lares (g de N ha⁻¹ mes⁻¹)

Mes	Sistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	18.19 (3.41) a	7.94 (1.15) a	17.39 (3.85) a
Mayo	11.24 (2.35) a	16.08 (4.63) ab	10.54 (2.40) a
Junio	10.61 (0.53) a	16.07 (2.46) ab	11.02 (1.63) a
Julio	16.69 (1.71) a	18.37 (2.59) b	16.00 (1.55) a
Agosto	16.04 (1.64) a	9.76 (0.69) ab	14.73 (1.70) a
Septiembre	17.14 (2.70) a	11.71 (0.75) ab	16.18 (2.11) a
Promedio	14.98	13.32	14.31

^aValores expresados en gramos de N/hectárea/mes con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

La fijación de N₂ en suelo en la localidad de Las Marías varió de 11.01 a 16.86 g de N ha⁻¹ mes⁻¹ en el sistema de café a sol (Tabla 17). En el café con sombra la fijación de N₂ varió de 13.58 a 68.57 g de N ha⁻¹ mes⁻¹, siendo significativamente mayor que en el café a sol. En este agrosistema se encontró significativamente mayor fijación de N₂ en el mes de junio que en los meses de mayo, agosto y septiembre. En el ecosistema de bosque la fijación de N₂ varió de 12.96 a 37.77 g de N ha⁻¹ mes⁻¹. No se encontraron diferencias significativas en la fijación de N₂ entre los meses en los sistemas de café a sol y bosque.

Tabla 17. Fijación promedio mensual de N₂ en suelo de plantas de café y bosque por ecosistema en la localidad de Las Marías.^a

Mes	Sistema		
	Sol	Sombra	Bosque
Abril	16.86 (2.48) a	27.74 (9.90) ab	37.77 (17.46) a
Mayo	14.02 (1.77) a	13.58 (2.05) a	15.04 (1.10) a
Junio	13.95 (2.26) a	68.57 (24.52) b	20.29 (1.93) a
Julio	15.17 (1.28) a	25.71 (7.56) ab	13.60 (0.92) a

Agosto	14.75 (1.22) a	13.89 (2.13) a	13.89 (1.71) a
Septiembre	11.01 (0.92) a	13.93 (1.75) a	12.96 (1.13) a
Promedio	14.29	27.23	18.92

“Valores expresados en gramos de N/hectárea/mes con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)”

5.2.4.2 Suelo de *Inga vera*

No se encontraron diferencias significativas en la fijación de N_2 entre el suelo del café con sombra, el suelo a 0.5 y 1.2 metros del árbol de *Inga* y el suelo de bosque. Se observó consistentemente, en las localidades de Jayuya y Las Marías, cerca de dos veces mayor fijación de N_2 en el suelo del agrosistema de café con sombra que en el suelo de café a pleno sol. En la localidad de Lares no se observaron diferencias significativas entre los agrosistemas.

En la localidad de Jayuya, la fijación de N_2 en el suelo del agrosistema de café con sombra y bosque fue 2.2 veces mayor que en el agrosistema de café a pleno sol (Tabla 18). Las mismas tendencias observadas en la localidad de Jayuya se observaron en Las Marías aunque en menor intensidad. Sólo se encontraron diferencias significativas entre el suelo del sistema de café a sol (14.29 g de N ha^{-1} periodo⁻¹) y el suelo a 0.5 m de los árboles de *Inga* (31.99 g de N ha^{-1} periodo⁻¹). En estas dos localidades se observó 1.4 y 1.2 mayor fijación de N_2 en el suelo a 0.5 m de las *Inga* que en el suelo a 1.2 m, pero ésta no es significativamente diferente.

A diferencia de lo observado en las localidades de Jayuya y Las Marías, en Lares no se encontraron diferencias significativas en la fijación de N_2 en el suelo de los diferentes ecosistemas. La fijación de N_2 en el suelo de *Inga* de esta localidad varió de 11.61 a 13.23 g de N ha^{-1} periodo⁻¹ a 1.2 y 0.5 metros del árbol respectivamente.

Tabla 18. Fijación promedio de N_2 en suelo por ecosistema en cada localidad.^a

Suelo	Jayuya	Lares	Las Marías
Sol	11.07 (0.51) a	14.98 (0.96) a	14.29 (0.72) a
Sombra	22.56 (3.27) b	13.32 (1.09) a	27.23 (5.14) ab
<i>Inga</i> (0.5 m)	34.23 (6.68) b	13.23 (1.34) a	31.99 (4.62) b
<i>Inga</i> (1.2 m)	24.88 (4.36) b	11.61 (0.63) a	26.89 (4.06) ab

Bosque	17.90 (1.20) b	14.31 (0.98) a	18.92 (3.06) ab
Promedio	0.269	0.164	0.290

^aValores expresados en gramos de N/hectárea/periodo con errores estándar en paréntesis. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

5.2.5 Fijación total de nitrógeno

Al sumar la cantidad de N fijado por todos los componentes del sistema, se encontró que el agrosistema de café con sombra tiene la capacidad de fijar dos veces más N que el agrosistema de café a sol, en las localidades de Jayuya y Las Marías. En el sistema de café con sombra se fijó un total de 26.82 g de N ha⁻¹ periodo⁻¹ en Jayuya y 32.85 g de N ha⁻¹ periodo⁻¹ (Tabla 19). En Lares se fijó cerca de dos veces menos N en el café con sombra que en el café a sol.

Dentro de los componentes evaluados, el suelo demostró tener mayor capacidad de fijar N₂. Este fijó cerca de 300 veces más N₂ que la hojarasca (segundo componente con mayor fijación de N₂). Los líquenes fijaron 13 veces menos N₂ por hectárea que lo que se fijó en la hojarasca.

Tabla 19. Fijación total de N₂ calculada para todos los componentes por ecosistema (g de N ha⁻¹ periodo⁻¹)

Localidad	Componente	Sol	Sombra	Bosque	Total
Jayuya	Suelo <i>Inga</i> 0.5 m	n/a	1.20	n/a	1.20
	Suelo <i>Inga</i> 1.2 m	n/a	3.02	n/a	3.02
	Hojas	0.103	n/d	n/a	0.103
	Suelo	11.07	22.56	17.90	51.53
	Hojarasca	0.038	0.038	0.11	0.19
	Liquen	0.0014	n/d	0.010	0.011
Total		11.21	26.82	18.02	56.05
Lares	Suelo <i>Inga</i> 0.5 m	n/a	0.59	n/a	0.59
	Suelo <i>Inga</i> 1.2 m	n/a	2.10	n/a	2.10
	Hojas	0.029	0.027	n/a	0.056
	Suelo	14.98	13.32	14.31	42.61
	Hojarasca	0.034	0.026	0.051	0.11
	Liquen	0.0004	0.0003	0.016	0.017

Total		15.04	16.06	14.38	45.48
Las Marías	Suelo <i>Inga</i> 0.5 m	n/a	1.25	n/a	1.25
	Suelo <i>Inga</i> 1.2 m	n/a	4.31	n/a	4.31
	Hojas	0.099	0.032	n/a	0.13
	Suelo	14.29	27.23	18.92	60.44
	Hojarasca	0.041	0.029	0.052	0.12
	Liquen	0.0008	0.0006	0.0029	0.0043
Total		14.43	32.85	18.97	66.25

5.3 Contenido de Nitrógeno en Hojas de Café

La concentración de N en las hojas de café varió de 2.61 a 3.39 % (Tabla 22). En la localidad de Las Marías, el contenido de N en las hojas fue significativamente mayor en el cultivo de café con sombra que en el café a pleno sol.

El contenido de N en la biomasa de las hojas de café varió de 27.79 a 50.48 kg de N ha⁻¹ (Tabla 21). En el agrosistema de café a sol en la localidad de Jayuya y Lares se observó mayor contenido de N debido a la mayor densidad de plantas que se encuentra en este sistema. En la localidad de Las Marías se observó mayor contenido de N en el agrosistema de café con sombra.

Tabla 20. Contenido de nitrógeno orgánico total en hojas de café a sol y con sombra en Jayuya, Lares y Las Marías

Localidad	Sistema	% N _{org}	Kg N/ha
Jayuya	Sol	3.10 a	50.48
	Sombra	2.86 a	28.14
Lares	Sol	2.61 a	31.79
	Sombra	2.87 a	27.79
Las Marías	Sol	2.85 a	33.57
	Sombra	3.39 b	38.60

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p ≤ 0.05)
 % N_{org}=Nitrógeno orgánico total

5.3.1 Contenido ^{15}N en agrosistemas de café en Las Marías

El contenido de $\delta^{15}\text{N}$ en los sistemas bajo estudio varió de -0.04 a 2.42, exhibiendo poca variabilidad (Tabla 22). Se encontró que el árbol de referencia en el sistema de bosque (*Guarea guidonia*) obtuvo el menor contenido de $\delta^{15}\text{N}$. Mientras que el árbol fijador de N obtuvo el mayor contenido de $\delta^{15}\text{N}$.

Tabla 21. Contenido de ^{15}N en hojas de agrosistemas de café en Las Marías

Agrosistema	$\delta^{15}\text{N}$
Café a sol	2.11
Café con sombra	2.41
<i>Inga vera</i> en café	2.42
<i>Guarea guidonia</i> en bosque	-0.04

5.4 Biomasa Aérea y Almacenamiento de Carbono

5.4.1 Biomasa y carbono almacenado en plantas de café

En los arbustos de café la biomasa varió de 6.02 a 10.59 toneladas hectérea⁻¹. De igual forma, el contenido de C en las plantas varió de 3.01 a 5.29 toneladas hectérea⁻¹ (Tabla 23). La biomasa y el contenido de C resultaron ser significativamente mayores en las parcelas de café a sol que en las parcelas de café a sombra ya que hay mayor densidad de plantas en los sistemas de café a sol. No hubo diferencia significativa en diámetro ni altura entre las plantas de café de los diferentes sistemas y localidades.

Tabla 22. Biomasa aérea y contenido de carbono en plantas de café.

Localidad	Café a sol		Café con sombra	
	AGB (Ton/Ha)	Cont C (Ton/Ha)	AGB (Ton/Ha)	Cont C (Ton/Ha)
Jayuya	10.59	5.29	6.02	3.01
Lares	7.77	3.89	6.29	3.14
Las Marías	7.60	3.80	6.61	3.31
Promedio	8.65	4.33	6.31	3.15

AGB=Aboveground biomass (biomasa aérea)

5.4.2 Biomasa y carbono almacenado en árboles de sombra

La biomasa aérea de los árboles de sombra varió de 13.56 ton ha⁻¹ en la localidad de Las Marías a 96.38 ton ha⁻¹ en Jayuya (Tabla 24). En la localidad de Jayuya se obtuvo la mayor cantidad de biomasa ya que se encontraban árboles de mayor diámetro y altura que en las otras localidades. De igual forma el contenido de C en los árboles de sombra de Jayuya fue mayor (48.19 ton ha⁻¹). En las localidades de Lares y Las Marías los valores son más cercanos a los que se han encontrado en otros estudios de café con *Inga sp.*

Tabla 23. Biomasa aérea y contenido de carbono en árboles de sombra en las plantaciones de café con sombra

Localidad	AGB (Ton/Ha)	Cont C (Ton/Ha)
Jayuya	96.38	48.19
Lares	17.29	8.64
Las Marías	13.56	6.78
Promedio	42.41	21.20

AGB=Aboveground biomass (biomasa aérea)

5.4.3 Carbono almacenado en suelo

Con el porcentaje de C encontrado por López (2008) en las localidades bajo estudio, se calculó el carbono almacenado en el suelo. Este varió de 25.7 a 56.4 ton de C ha⁻¹ (Tabla 25). Encontrándose la mayor concentración de C en el bosque y la menor en el sistema de café a sol.

Tabla 24. Carbono almacenado en el suelo de los tres ecosistemas y localidades

Ecosistema	Localidad	Ton C/Ha	Promedio C (Ton/Ha)
Sol	Jayuya	32.0	32.1
	Lares	27.7	
	Las Marías	36.6	
Sombra	Jayuya	38.4	35.2

	Lares	25.7	
	Las Marías	41.6	
Bosque	Jayuya	48.9	50.8
	Lares	47.1	
	Las Marías	56.4	

En la tabla 26 se presenta el total de contenido de C en la biomasa aérea y el suelo en cada ecosistema. En esta tabla se puede observar que en el suelo se almacena mayor cantidad de C que en la biomasa aérea. Comparando los tres ecosistemas se observa que el bosque tiene mayor capacidad de secuestrar C que los agrosistemas de café. Entre los agrosistemas, el café con sombra tiene mayor capacidad de secuestrar C que el café a pleno sol.

Tabla 25. Contenido de C total en los tres agrosistemas

Ecosistema	Contenido C en AGB (Ton/Ha)	Contenido C en suelo (Ton/Ha)	Contenido C Total (Biomasa Aérea + Suelo)
Sol	4.33	32.09	36.42
Sombra	24.41	35.24	59.65
Bosque	42.83	50.80	93.63

6 DISCUSIÓN

6.1 Área de estudio

6.1.1 Caracterización del área de estudio

6.1.1.1 Nivel de iluminación

El nivel de iluminación promedio para el agrosistema de café a sol fue 49,711 lux. Como era de esperarse, éste fue significativamente mayor al nivel de iluminación en el agrosistema de café con sombra (4,878 lux) y en el sistema de bosque (1,794 lux).

6.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

6.2.1 Fijación de nitrógeno en hojarasca

En el componente de hojarasca se rechaza la hipótesis nula ya que la fijación de N_2 en los sistemas de bosque fue significativamente mayor que en los sistemas de café a sol y con sombra en las localidades de Jayuya y Lares. En la localidad de Las Marías se encontró 1.9 veces mayor fijación de N_2 en el bosque que en el agrosistema de café con sombra y la fijación de N_2 en el sistema de café a sol no fue significativamente diferente a la encontrada en el bosque ni en el café con sombra.

A pesar de que la tasa de fijación en hojarasca calculada para los sistemas de bosque es mayor a la de los agrosistemas de café, ésta es menor a la encontrada en la hojarasca de otros bosques. En la tabla 27 se presenta la fijación de N_2 en hojarasca reportada para otros ecosistemas. La fijación de N_2 en hojarasca de otros estudios varía de 0.05 a 5.48 kg de N ha^{-1} año⁻¹. Mientras que en otros, la variación en fijación de N_2 a través del tiempo es poca (Heath *et al.* 1988, O'Connell y Grove 1987). En los lugares donde se observa mucha variación se debe

principalmente a la temporada (Reed *et al.* 2007), tipo de bosque (Vitousek y Hobbie 2000), edad del bosque y concentración de nutrientes (Crews *et al.* 2000).

En este estudio la fijación de N₂ varió de 0.102 a 0.224 g de N ha⁻¹ año⁻¹. Uno de los factores para que la tasa de fijación de N₂ en estos bosques haya sido tan baja lo es la edad de los bosques bajo estudio, menos de 30 años. Las especies de árboles encontradas en estos bosques son características de bosques secundarios, mientras que los bosques utilizados para comparación son bosques maduros de más de 30 años de edad. Esto sugiere que los sistemas estudiados no se han recuperado de la degradación a la que fueron sometidos.

Tabla 26. Fijación asimbiótica de nitrógeno en hojarasca de ecosistemas de bosque

Región	Fijación de N₂ en hojarasca	Referencias
South Westland, Nueva Zelandia	1-2 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	Menge y Hedin 2009
Bosque húmedo tropical, Costa Rica	0.36 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹ en temporada seca a 5.48 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹ en temporada húmeda	Reed <i>et al.</i> 2007
Isla Chiloé, Chile	0.23 – 2.26 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	Pérez <i>et al.</i> 2003
Hawaii	0.05-1.25 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	Crews <i>et al.</i> 2000
Bosques húmedos y secos, Hawaii	0.2- 1.0 kg N ha ⁻¹ durante descomposición (bosque húmedo) 4.3 kg N ha ⁻¹ durante descomposición (bosque seco)	Vitousek y Hobbie 2000
Bosque húmedo, Hawaii	0-5 nmol C ₂ H ₂ g peso seco ⁻¹ h ⁻¹ (25 días) 20-45 nmol C ₂ H ₂ g peso seco ⁻¹ h ⁻¹ (70 días)	Thompson y Vitousek 1997
Oregon, USA	0.4-1.1 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	Heath <i>et al.</i> 1988
Suroeste, Australia	0.4-2.0 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	O'Connell y Grove 1987
North Carolina, USA	0.63 kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	Todd <i>et al.</i> 1978

La tasa de fijación de N₂ mensual en hojarasca en la localidad de Jayuya no fue significativamente diferente entre los meses en el sistema de café a pleno sol. Sin embargo, en el agrosistema de café con sombra se obtuvo la menor tasa de fijación de N₂ en los meses de mayo y agosto aunque ésta sólo fue significativamente diferente a la fijación encontrada para el mes de

abril. En el sistema de bosque se encontró significativamente mayor fijación de N_2 los meses que hubo mayor precipitación, agosto y septiembre. En la localidad de Lares no se encontraron diferencias significativas en fijación de N_2 entre los meses en los sistemas de café a sol y bosque. En el sistema de café con sombra se obtuvo significativamente mayor fijación de N_2 en el mes de junio. En este mes se obtuvo relativamente la misma precipitación que para los meses de mayo y julio por lo que deben existir otros factores además de la precipitación que afecten la fijación de N_2 en este sistema. En la localidad de Las Marías sólo se encontraron diferencias significativas entre los meses en el sistema de café a sol. En los otros dos sistemas, café con sombra y bosque, no se obtuvieron diferencias significativas entre los meses.

A diferencia de la poca variabilidad encontrada entre los meses en este estudio, Reed *et al.* (2007) reportaron diferencias en fijación de N_2 en hojarasca por temporada, ocurriendo la mayor en la temporada de lluvia. De igual forma, O'Connell y Grove (1987) encontraron menor fijación de N_2 en el verano, cuando hay menor humedad, y mayor fijación de N_2 en la primavera cuando la humedad es alta y la temperatura aumenta en bosques del suroeste de Australia. Factores como la humedad (Roskoski 1980b) y la temperatura pueden afectar la fijación de N_2 por temporada (Hicks *et al.* 2003). Los cambios en precipitación pueden afectar concentraciones de P y N en la hojarasca (Wood *et al.* 2005) y concentraciones de C orgánico disuelto (Reed *et al.* 2007) que a su vez pueden afectar la fijación de N_2 a través del tiempo. Por lo tanto, cuando se estiman tasas de fijación de N_2 anual se deben considerar las interacciones estacionales de factores abióticos (Hicks *et al.* 2003).

Las diferencias observadas en fijación de N_2 entre los meses en los sistemas de café con sombra y bosque en la localidad de Jayuya, en el café con sombra en Lares y en el sistema de café a sol en Las Marías deben estar influenciadas por otros factores no influenciados directamente por la humedad. Las medidas de precipitación en estas localidades fueron tomadas de promedios mensuales obtenidos por estaciones permanentes del Centro de Investigación Atmosférica del Caribe en la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez cerca de los lugares bajo estudio. Por lo tanto, no se tienen medidas de precipitación en los lugares exactos y días de recolección o cercanos a la recolección. Tampoco se tienen medidas de concentración de

nutrientes en la hojarasca los días de muestreo. La concentración de nutrientes en la hojarasca puede variar temporalmente por la precipitación (Wood *et al.* 2005) y a su vez puede afectar la fijación de N₂. Debido a que no se tomaron medidas de precipitación, temperatura, concentración de nutrientes en los lugares y días exactos en que se tomaron las muestras, no se puede concluir cuales factores tuvieron efecto en las diferencias en fijación de N₂ mensual. Por lo tanto, se recomienda para futuros estudios tomar medidas para determinar el efecto de estos factores en la fijación de N₂ a través del tiempo.

La fijación de N₂ por bacterias heterotróficas en la hojarasca se puede ver afectada por varios factores, además de los ya discutidos. Uno de los factores es la calidad de la hojarasca expresada como el contenido de lignina o la relación C:N. Algunos autores han encontrado que la hojarasca con bajo contenido de carbono o altas concentraciones de lignina inhiben la descomposición y fijación heterotrófica de N₂ (Vitousek y Hobbie 2000, Thompson y Vitousek 1997). Sin embargo, la relación C:N encontrada en la hojarasca de los sistemas bajo estudio varía de 15 a 24 (Tabla 28, López 2008), siendo la menor en el bosque de Jayuya y la mayor en el bosque de Lares. Estos valores no son lo suficientemente bajos para inhibir la fijación de nitrógeno. Por lo tanto, deben existir otros factores afectando la fijación de nitrógeno en estos lugares.

Tabla 27. Contenido anual de C, N y la razón C:N en la hojarasca proveniente de los ecosistemas en Jayuya, Lares y Las Marías

Ecosistema	Componente	Localidad		
		Jayuya	Lares	Las Marías
CSL		648 a	612 a	536 a
CSM	C (kg ha ⁻¹ año ⁻¹)	1095 b	1132 b	1111 b
BQS		733 ab	960 b	941 b
CSL		32 a	29 a	32 a
CSM	N (kg ha ⁻¹ año ⁻¹)	50 b	50 b	56 b
BQS		49 ab	39 ab	41 ab
CSL		20 a	21 a	17 a
CSM	Razón C:N	22 a	23 a	20 a
BQS		15 b	24 ab	23 ab

*Letras distintas en una misma localidad indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).
 CSL = Café a sol, CSM = Café con sombra, BQS = Bosque. Tomado de López (2008)

Por otro lado, la relación C:N del suelo también puede afectar la fijación de N₂ en la hojarasca. Valores de la relación C:N menores de 10 pueden inhibir la fijación de N₂. Además, la actividad de fijación de N₂ por cianobacterias puede aumentar con un aumento en la relación C:N (Liengen y Olsen 1997). La relación C:N en el suelo de todos los ecosistemas estudiados fue menor a 10 lo que puede explicar la baja tasa de fijación de N₂ (Tabla 29).

Otros autores indican que la inhibición de fijación de N₂ por N combinado puede estar más relacionada con la relación de N:P disponible (Eisele *et al.* 1989, Smith 1992). La adición de P al suelo estimula la fijación heterotrófica de N (Crews *et al.* 2000, Vitousek y Hobbie 2000, Vitousek 1999). En los ecosistemas bajo estudio se encontró una concentración de P alta en el bosque de Jayuya y en el bosque y el sistema de café con sombra de Lares, mientras que en Las Marías la concentración de P fue la más baja (Tabla 29). No se encontró relación entre la concentración de P y la fijación de N₂ en las localidades ni en los agrosistemas.

Tabla 28. Propiedades químicas de los suelos estudiados a una profundidad de 0-20 cm en café a sol (CSL), café con sombra (CSM) y bosque (BQS)

Localidad	Ecosistema	pH _{H2O}	pH _{KCl}	N _{total}	MO	C _{total}	C:N	P
					%			mg kg ⁻¹
Jayuya	CSL	4.25	3.58	0.26	2.78	1.24	4.77	9.85
	CSM	4.61	3.66	0.34	4.10	1.83	5.38	11.79
	BQS	4.87	3.95	0.44	5.18	2.42	5.50	25.10
Lares	CSL	4.29	3.64	0.19	2.82	1.27	6.68	10.47
	CSM	4.49	3.75	0.21	2.84	1.26	6.00	24.24
	BQS	4.52	3.79	0.30	3.56	2.59	8.63	28.24
Las Marías	CSL	4.31	3.71	0.28	3.36	1.50	5.36	5.64
	CSM	4.32	3.75	0.32	4.43	1.98	6.19	7.18
	BQS	5.92	5.14	0.35	5.96	2.66	7.60	7.67

pH_{H2O}= pH en agua, pH_{KCl}= pH con 1M KCl, N_{total}= nitrógeno total, MO = materia orgánica, C_{total}= carbono total, C:N= Relación carbono-nitrógeno y P= fósforo disponible.

Tomado de López (2008)

La disponibilidad de algunos micronutrientes también afecta la fijación de N₂. Uno de los nutrientes que no se evaluó y puede afectar grandemente la fijación de N₂ es el molibdeno (Mo).

Recientemente se ha encontrado que la falta de Mo solamente, puede limitar la fijación de nitrógeno por bacterias heterotróficas de vida libre (Barron *et al.* 2009).

Otros factores como el pH y la humedad del suelo han demostrado tener un efecto en la fijación de N₂. Crews *et al.* (2000) encontraron que el aumento en pH tuvo un efecto significativo en el aumento de la fijación de nitrógeno por organismos heterotróficos. En los ecosistemas estudiados el pH de los suelos fue ácido variando de 4.25 a 5.92 (Tabla 29), lo que puede disminuir la actividad de bacterias diazotróficas en estos sistemas (Sprent y Sprent 1990). La humedad también puede afectar la fijación de N₂ (Reed *et al.* 2007). En este estudio, para evaluar el efecto de humedad sólo se tomó en consideración la precipitación mensual en los lugares. Un futuro trabajo debe medir la humedad de la hojarasca y el suelo al momento del muestreo.

La aportación anual de hojarasca en los ecosistemas bajo estudio es menor a lo reportado por otros autores (López 2008). Esto puede influir la fijación de N₂ en la hojarasca ya que mayor cantidad de materia orgánica estimula la actividad de bacterias fijadoras de N₂ (Granhall y Lindberg 1980). Si en estos ecosistemas hay menor cantidad de materia orgánica es posible que el hábitat sea desfavorable para los microorganismos fijadores. Además, la materia orgánica tiene una alta capacidad de retener agua por lo tanto, es posible que en estos ecosistemas haya menos capacidad de retención de agua y por ende un hábitat menos adecuado para los microorganismos fijadores que los sistemas usados para comparar.

Múltiples factores se intersectan en la zona de estudio que han demostrado limitar la capacidad de fijación de N₂ en el suelo y diferentes sustratos. La combinación de todos estos factores y su interacción con la fijación de nitrógeno, sugiere que los sistemas de bosque húmedo secundario en esta zona tienen una menor capacidad de fijación de nitrógeno y que otros modelos comparativos deben ser usados para esta zona.

6.2.2 Fijación de nitrógeno en filósfera de plantas de café

En el componente de la filósfera de las plantas de café, se acepta la hipótesis nula. La fijación promedio de N₂ en éste fue similar en los dos agrosistemas. La fijación de N₂ promedio

fue menor a la reportada por Roskoski (1980a) pero los resultados coinciden en la poca o ninguna variación entre los agrosistemas. Por lo tanto, la ausencia o presencia de sombra no afecta el microambiente de los epifilos fijadores de N de forma que causen diferencias en la tasa de fijación (Roskoski 1980a).

La fijación de N₂ en la filósfera de las plantas de café en los dos agrosistemas bajo estudio (café a sol y con sombra) varió de 0 a 0.16 nmoles de N fijado hoja⁻¹ día⁻¹. La tasa de fijación de N₂ encontrada por Roskoski (1980a) en hojas de café con epifilos varía de 0.1 a 9.1 nmoles N fijado hoja⁻¹ día⁻¹. La tasa de fijación anual calculada en su estudio fue baja, variando de 0.7 g de N ha⁻¹ año⁻¹ en las parcelas de café sin sombra a 1.4 g de N ha⁻¹ año⁻¹ para las parcelas con sombra. Además, encontró que las tasas de reducción de acetileno fueron similares a través del año. En este estudio la fijación de N₂ en la filósfera fue menor a la reportada por Roskoski (1980a) y estas no variaron a través de los meses. En la localidad de Las Marías la fijación de N₂ en la filósfera fue de 0.06 y 0.2 g de N hectárea⁻¹ año⁻¹ en el café con sombra y el café a sol respectivamente. Se puede observar tres veces mayor fijación de N₂ en el café a sol posiblemente por la mayor densidad de plantas en este. Murty (1983) calculó tasas de reducción de acetileno mayores a las encontradas en el café, de 37.36 a 230.36 nmoles de C₂H₄ g⁻¹ hora⁻¹ para algunas plantas de valor económico, como la mora (*Morus indica*) y *Eleusine coracana*. Esto sugiere que la planta de café tiene baja capacidad de fijar N₂ en su filósfera.

La tasa promedio mensual fue similar en todas las localidades y agrosistemas a través de los seis meses. En la única localidad donde se encontraron diferencias significativas fue en Jayuya en el agrosistema de café a sol. Estas fueron en el mes de febrero, cuando se obtuvo significativamente mayor fijación de N₂ que en los meses de junio y septiembre. Las diferencias encontradas en estos meses deben estar influenciadas por otros factores además de la precipitación ya que en el mes de febrero hubo menos precipitación que en los meses de junio y septiembre. Por los resultados obtenidos se puede decir que los factores microambientales que controlan la fijación de N₂ en la superficie de las hojas son constantes a través de los meses (Roskoski 1980a).

Existen varios factores que afectan la fijación de N_2 en la filósfera, desde los compuestos nitrogenados que entran por medio de la lluvia hasta el N disponible en el suelo. Los compuestos nitrogenados de la lluvia pueden estar sufriendo el N suficiente a la filósfera (Roskoski 1980a). Por otro lado, la lluvia también puede diluir la concentración de carbohidratos en la superficie de las hojas (Ruinen 1974), que los microorganismos de vida libre necesitan para su energía. En el suelo, concentraciones altas de N pueden disminuir exudación de carbohidratos por las hojas, lo que puede afectar la fijación de N_2 por epífitos. En este caso el porcentaje de N en el suelo de los ecosistemas estudiados varía de 0.2 a 0.3, lo cual se encuentran en un rango intermedio (Muñiz-Torres 1986) y no debe afectar la fijación de N_2 .

La nutrición mineral de las plantas va a tener efecto en la fijación de N_2 en la filósfera. Si la planta tiene deficiencias nutricionales va a disminuir el crecimiento de microorganismos fijadores y por ende la fijación de N_2 , la cual es dependiente de la disponibilidad de Mo y Fe. Como en la fijación en hojarasca la fijación en la filósfera puede ser inhibida por altos niveles de O_2 (Ruinen 1974). Se especula nuevamente que altos niveles de O_2 , bajos niveles de humedad y un posible déficit nutricional en el suelo contribuyen a la baja fijación de nitrógeno en estos sistemas.

Uno de los factores más importantes para la fijación de N_2 en la filósfera es la disponibilidad de agua en la superficie de las hojas, la cual se puede afectar en 2 a 3 días sin lluvia (Freiberg 1998). A medida que la hoja se seca la fijación de N_2 puede disminuir dramáticamente (Bentley 1987). La variación en humedad en la superficie de la hoja puede afectar la transferencia de nutrientes de la hoja a la filósfera y por lo tanto, al desarrollo de poblaciones en la filósfera (Ruinen 1961). Existe la posibilidad de que las hojas hayan perdido humedad en los frascos donde se tomaron las muestras, lo que pudo haber disminuido la fijación de N_2 . Si los organismos tienen un suministro de agua suficiente, la tasa de fijación de N_2 va a depender de la intensidad de luz y la temperatura del aire (Freiberg 1998), a mayor intensidad de luz, mayor fijación de N_2 (Freiberg 1998, Bentley 1987). Para futuros estudios se deben considerar estos factores y tomar medidas de disponibilidad de agua en la superficie de las hojas, temperatura e intensidad de luz al momento de medir la reducción de acetileno.

También se ha reportado que la fijación de N_2 se puede mantener sólo si el valor de C/N de los lixiviados de la hoja es mayor a 10 (Bessems 1973 citado por Murty 1983). La razón C/N en el suelo de todos los lugares bajo estudio fue menor de 10. Por lo tanto, es posible que los lixiviados de las hojas de café tengan una razón C/N menor de 10 y estén afectando la fijación de N_2 en estos ecosistemas. Se recomienda evaluar la razón C/N de los lixiviados de las hojas para determinar si éste es uno de los factores afectando la fijación de N_2 en estas localidades.

Además, se desconoce si existe una población de bacterias fijadoras en la filósfera del café de los agrosistemas estudiados, lo que puede limitar la fijación de N_2 . Para trabajos futuros se recomienda evaluar las poblaciones de microorganismos presentes en la filósfera del café. Es posible que a pesar de que exista una población de microorganismos fijadores de N_2 en estos sistemas, la fijación sea baja como han encontrado Gajendiran y Mahadevan (1989) o como sugiere Roskoski (1980a), la fijación de N_2 en la filósfera del café es poco significativa. Algunos investigadores piensan que los estimados que han sido reportados de fijación de N_2 para la filósfera son muy altos (Jones 1982). Por lo tanto, se deben evaluar todos los factores que afecten la fijación de N_2 en este hábitat para poder llegar a conclusiones más precisas.

Fürnkranz *et al.* (2008) encontraron que la fijación de N_2 en la filósfera varía de acuerdo a la especie de la planta hospedera y está mayormente mediada por microorganismos asociados con epífitas como briofitas. Las hojas evaluadas en este estudio no se observaron con crecimiento de epífitas. Los resultados obtenidos por Murty (1983) indican que plantas con superficies de hoja poco permeable a nutrientes tienen menor capacidad de fijar N_2 en la filósfera. Por lo tanto, con los resultados obtenidos por Roskoski (1980a) y los obtenidos en este estudio se podría concluir que el café tiene poca capacidad para fijar N_2 en su filósfera.

6.2.3 Fijación de nitrógeno en líquenes

La fijación de N_2 por líquenes no fue significativamente diferente entre los ecosistemas, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula. La tasa promedio de reducción de acetileno obtenida para todos los agrosistemas fue $0.0010 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ cm}^{-2} \text{ hora}^{-1}$ o $0.085 \text{ nmoles de C}_2\text{H}_4$ producido

g de peso seco⁻¹ hora⁻¹. Estas son menores a las reportadas por otros autores. Matzek y Vitousek (2003) encontraron tasas de reducción de acetileno de 0.1532 a 2.988 nmoles de C₂H₄ producido cm⁻² hora⁻¹ para el líquen *Pseudocyphellaria crocata* en Hawaii. Para líquenes foliosos en Nueva Zelanda, Menge y Hedin (2009) reportaron tasas de reducción de acetileno de menos de 0.024 a 61.5 nmol C₂H₄ cm⁻² hora⁻¹. En Madrid se han reportado tasas de 1.62 a 96.14 nmoles de C₂H₄ producido g de peso seco⁻¹ hora⁻¹ con mínimos de 0.14 a 0.21 nmoles de C₂H₄ producido g de peso seco⁻¹ hora⁻¹ (Müller *et al.* 1989) los cuales se acercan a los valores máximos obtenidos en los ecosistemas de café a sol y con sombra, 1.41 y 0.55 nmoles de C₂H₄ producido g de peso seco⁻¹ hora⁻¹, respectivamente.

Müller *et al.* (1989) además, encontraron fluctuaciones en reducción de acetileno muy marcadas a lo largo del año. En este estudio no se encontraron diferencias significativas en fijación de N₂ por líquenes entre los meses. Es posible que en estas localidades los factores microambientales que afectan la fijación de N₂ en los líquenes sean constantes a través del tiempo. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ecosistemas. Por lo tanto, es posible que la ausencia o presencia de sombra no afecte el microambiente de los líquenes de forma que causen diferencias en la tasa de fijación.

Los sistemas bajo estudio, a diferencia de los utilizados para comparación, son sistemas manejados y altamente perturbados. El ecosistema de bosque bajo estudio es de menos de treinta años de edad, mientras que los bosques de otros estudios tomados para comparación son bosques maduros. Por esta razón, el área cubierta por líquenes en el bosque es hasta 50 veces menor al área cubierta por líquenes en otros estudios como el de Matzek y Vitousek (2003) y el de Menge y Hedin (2009). Es posible que las tasas bajas en reducción de acetileno también estén relacionadas con las especies de líquenes muestreados. En los bosques bajo estudio se utilizaron líquenes de crecimiento crustoso mayormente, mientras que en los agrosistemas de café se observaron mayormente líquenes de crecimiento folioso. La mayoría de los estudios reportan fijación de N₂ para especies de líquenes foliosos. En el estudio de Menge y Hedin (2009) casi todo el N fijado por líquenes provenía de líquenes foliosos. Por lo tanto, es posible que las

especies de líquenes encontradas en el bosque (líquenes crustosos mayormente) tengan menor capacidad de fijar N_2 que los líquenes de crecimiento folioso.

En términos de área, se encontró que en el bosque se puede fijar significativamente más N_2 que en los ecosistemas de café, posiblemente por la mayor densidad de líquenes en el bosque. La densidad promedio de líquenes encontrada en el bosque fue $36 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$, mientras que en los agrosistemas de café a sol y con sombra fue 2.5 y $1.6 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$ respectivamente. En el ecosistema de bosque se calcularon $0.02 \text{ g de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mientras que en los ecosistemas de café a sol y con sombra se fijaron 0.0017 y $0.0009 \text{ g de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ respectivamente. A pesar de que en el bosque se observa mayor fijación, ésta es menor de lo que se ha reportado para líquenes en otros ecosistemas. Matzek y Vitousek (2003), utilizando la técnica de reducción de acetileno, observaron fijación entre 0.0024 a $0.0781 \text{ kg de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ por *Pseudocyphellaria crocata* y otros líquenes en bosques lluviosos de Hawaii. Para *Stereocaulon vulvani* con la misma técnica se han reportado tasas de fijación de N_2 de 0.2 a $0.45 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Kurina y Vitousek 2001). En Nueva Zelanda se han reportado tasas de fijación de N_2 por líquenes de 0.02 a $2.0 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Menge y Hedin 2009). Mientras, en Colombia se calculó la tasa de fijación de N_2 por líquenes para un bosque lluvioso entre 1.5 a $8 \text{ kg de N hectárea}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Forman 1975).

Se observó en las tres localidades que la fijación de N_2 en líquenes no fue significativamente diferente entre los ecosistemas y los rangos de fijación de N_2 encontrados son menores a lo que se ha reportado. Además de los factores discutidos anteriormente que afectan la fijación de N_2 , en el caso de los líquenes se destacan otros factores. No sólo la disponibilidad de N controla la tasa de fijación, sino que puede estar más directamente relacionada con la relación N:P en el tallo de las plantas, mientras menor sea la relación mayor es la fijación de N (Bentley 1987, Matzek y Vitousek 2003, Benner *et al.* 2007). También el exudado de las hojas de las plantas puede constituir una fuente importante de nutrientes a los líquenes y altas concentraciones de N o poco P en estos pueden reducir la fijación (Matzek y Vitousek 2003). Por último, los líquenes dependen más de la atmósfera que del suelo para nutrientes, lo que aumenta las posibles variables que influyen en la fijación de nitrógeno por los líquenes.

6.2.4 Fijación de nitrógeno en suelo

6.2.4.1 Suelo de plantas de café

En el suelo la hipótesis nula se rechaza ya que se encontraron diferencias significativas en fijación de N_2 entre el sistema de café con sombra y el sistema de café a sol en las localidades de Jayuya y Las Marías. En estas dos localidades se encontró significativamente mayor fijación de N_2 en el suelo de café con sombra que en el suelo de café a sol. La tasa promedio de fijación de N_2 calculada para el suelo de las plantas de café fue $0.027 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ en el sistema a pleno sol. En el sistema de café con sombra la tasa de fijación promedio de N_2 fue $0.042 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mientras que en el suelo de bosque la tasa de fijación de N_2 fue $0.034 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. Los valores más altos en fijación de N_2 en el sistema de café con sombra demuestran que los árboles fijadores de N_2 están fijando N. En la localidad de Lares no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas por lo tanto, se acepta la hipótesis nula. En esta localidad a diferencia de las otras dos, no se observaron nódulos en las raíces de los árboles fijadores ya que el sistema de manejo en el café con sombra de esta localidad es más intensivo (mayor uso de agroquímicos) que en el café con sombra de Jayuya y Las Marías.

El promedio de fijación de N_2 calculado en las tres localidades y ecosistemas fue menor al encontrado en otros estudios. En la localidad de Las Marías en el sistema de café con sombra se obtuvo el promedio de fijación de N_2 más alto ($0.054 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$). La fijación de N_2 calculada para suelos de café por Roskoski (1982) fue de $0.5 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y no encontró diferencias en fijación de N_2 a través del tiempo ni entre sistemas de manejo. Unkovich y Baldock (2008) haciendo referencia a otros estudios sostienen que los insumos de N por medio de la fijación asimbiótica no son de importancia agronómica en muchas ocasiones. Estos promedian tasas de fijación de N_2 asimbiótica de $< 10 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ en cereales en Australia. Giller (2001) también sostiene que la cantidad de N_2 fijado por bacterias de vida libre en el suelo de diferentes cultivos no excede $5 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

La actividad de la nitrogenasa en las tres localidades y ecosistemas varió de 0.005 a 0.012 nmoles de C_2H_4 g de peso seco⁻¹ día⁻¹. Los valores observados en el agrosistema de café con sombra en Jayuya (0.010 nmoles de C_2H_4 g de peso seco⁻¹ día⁻¹) y Las Marías (0.012 nmoles de C_2H_4 g de peso seco⁻¹ día⁻¹), se acercan a los encontrados por Perotti *et al.* (1995) en suelos agrícolas de Argentina. Esto sugiere que los sistemas agrícolas tienen baja capacidad de fijar nitrógeno, a menos que se aumente la disponibilidad de C y disminuya la presencia de N inorgánico.

En el sistema de bosque se calcularon tasas de fijación de N_2 promedio de 0.17 a 0.23 kg de N ha⁻¹ año⁻¹. Estos valores son menores a los encontrados en otros bosques tropicales, donde se han encontrado tasas de fijación de N_2 de 0.26 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ en época seca a 2.71 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Reed *et al.* 2007). En bosques maduros del oeste de Estados Unidos se han encontrado tasas de fijación de N_2 de 0.178 a 0.656 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Jurgensen *et al.* 1991). En la revisión realizada por Jurgensen *et al.* (1991) también se han encontrado variaciones en fijación de N_2 anual las cuales varían según fluctuaciones en temperatura y humedad de suelo anual. En este estudio no se observaron diferencias significativas en la fijación de N_2 mensual en el ecosistema de bosque en las localidades de Lares y Las Marías. Sin embargo, en la localidad de Jayuya se observaron diferencias significativas pero estas no se correlacionan con la precipitación promedio obtenida en los meses evaluados. Por lo tanto, existen otros factores como humedad y temperatura de suelo que se deben evaluar en futuros experimentos que afectan la fijación de N_2 .

En bosques de Ontario se han encontrado tasas de fijación de N_2 asimbiótico de < 1 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Hendrickson 1990) en suelo. Mientras que en bosques siempreverdes de Chile se han reportado valores de 0.03 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Pérez *et al.* 2003). Los valores de fijación de N_2 calculados en este estudio, muestran que la fijación de N_2 en el suelo de los ecosistemas de bosque se encuentra dentro de los rangos obtenidos en otros estudios, pero son valores bajos dentro de estos rangos. Un factor que puede influir en las bajas tasas de fijación de N_2 encontradas en este estudio lo es el grado de degradación de los suelos. Los ecosistemas de bosque estudiados son bosques secundarios de no más de 30 años de edad, mientras que los

bosques tomados de referencia son mayormente bosques primarios o de más de 20 años de abandono.

6.2.4.2 Suelo de *Inga vera*

La tasa promedio de fijación de N₂ calculada en el suelo alrededor de arboles de *Inga vera* fue 4.9 g de N ha⁻¹ año⁻¹. Se pudo observar en las localidades de Jayuya y Las Marías que en el suelo alrededor de *Inga* hay significativamente mayor fijación de N₂ que en el suelo alrededor de plantas de café a pleno sol. En la localidad de Lares no se encontraron diferencias significativas en fijación de N₂ en suelo. En los análisis químicos de suelo realizados por López (2008), la única diferencia que existe entre este suelo y el de las otras localidades es el porcentaje de materia orgánica (MO). El porcentaje de MO en esta localidad es menor que en las otras localidades lo que podría disminuir la actividad microbiana (Albrecht *et al.* 2004). Sin embargo, el bosque y el agrosistema de café con sombra contienen mayor cantidad de P que las otras localidades (López 2008). Por lo tanto, en esta localidad debe haber una interacción de factores ambientales reduciendo la fijación de N₂.

La actividad de la nitrogenasa en el suelo de *Inga* varió de 0.005 a 0.015 nmoles de C₂H₄ g de peso seco⁻¹ día⁻¹ en Lares y Jayuya respectivamente. Perotti *et al.* (1995) encontró actividad de la nitrogenasa de trazas a 0.023 nmoles de C₂H₄ g de peso seco⁻¹ día⁻¹ en suelos agrícolas. Los valores encontrados en Jayuya y Las Marías están dentro de este rango. Sin embargo, la actividad de la nitrogenasa en Lares fue menor. Esto sugiere que los sistemas agrícolas tienen baja capacidad de fijar nitrógeno, a menos que se aumente la disponibilidad de C y disminuya la presencia de N inorgánico.

En cuanto a la fijación de N₂ en el suelo de los agrosistemas de café y de bosque, ésta varió 26.9 a 42.08 g de N ha⁻¹ año⁻¹. Al igual que para los otros sustratos, la fijación de N₂ encontrada en el suelo fue menor a la reportada en otros bosques tropicales. Sólo los valores encontrados en el agrosistema de sombra se acercan a los valores más bajos de fijación asimbiótica de N₂ encontrados por Reed *et al.* (2007) en la temporada seca en Hawaii (0.26 kg de N ha⁻¹ año⁻¹). Se

debe tener en cuenta que los bosques utilizados para comparación son bosques primarios mientras que los bosques en este estudio han sido perturbados y no tienen más de treinta años de edad. Esto sugiere que el suelo en estos ecosistemas no se ha recuperado, ya que pueden pasar décadas o siglos en lo que el carbono y los nutrientes del suelo se recuperan después de la vegetación haber sido perturbada (Jackson *et al.* 2000).

Los valores de fijación de N₂ encontrados en el suelo se acercan más a los que se han encontrado en bosques templados. En Chile, Pérez *et al.* (2003) encontraron una tasa de fijación de N₂ de 0.03 kg de N ha⁻¹ año⁻¹. Hendrickson (1990) reporta < 1 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ para bosques en Ontario y Jurgensen *et al.* (1991) encontraron de 0.18 a 2.89 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ para bosques en el Noroeste de Estados Unidos. Varios estudios en diferentes ecosistemas naturales en Estados Unidos han reportado tasas desde < 0.01 a 8.53 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Todd *et al.* 1978, Grant y Binkley 1987, DiStefano y Gholz 1989, Barkmann y Schwintzer 1998).

Al hacer comparaciones con otros sistemas se debe tener en cuenta que para medir la fijación de N₂ cada experimento se lleva a cabo bajo diferentes condiciones experimentales. Además, algunos estudios se llevan a cabo por cortos periodos de tiempo (1 año o menos) y Jurgensen *et al.* (1991) encontró que las fluctuaciones en fijación de N₂ por año pueden ser considerables. La variabilidad estacional también puede ser grande y muchos valores reportados de bosque se basan en material colectado en un solo punto en el tiempo (Heath *et al.* 1988). Esta es una de las desventajas principales de la técnica de reducción de acetileno. En este estudio se hicieron grandes extrapolaciones para poder comparar los resultados obtenidos con los reportados por otros autores. Por otra parte, el factor de conversión de reducción de acetileno a fijación de N₂ varía de acuerdo al sustrato que se utilice. Por lo tanto, en futuros estudios se debe utilizar la técnica de ¹⁵N para calibrar la técnica de reducción de acetileno y encontrar un factor de conversión para cada sustrato.

Tanto la fijación simbiótica como la fijación por organismos heterótrofos de vida libre dependen de muchos factores ambientales. El factor limitante principal en la fijación de N₂ por organismos de vida libre es la humedad (Son 2001). En algunos estudios la actividad de la

nitrogenasa ha sido mínima a menos de 30% de humedad de suelo (Hofmockel y Schlesinger 2007) y otros estudios han reportado aumento en fijación de N_2 con un aumento en humedad de suelo (Burgoyne 2007).

La relación N:P es otro factor importante. Varios estudios han reportado mayor actividad de nitrogenasa cuando la relación N:P es baja (Reed *et al.* 2007, Vitousek 1999, Eisele *et al.* 1989). De la misma forma la relación C:N afecta la fijación de N_2 , ya que las bacterias heterotróficas obtienen su energía de compuestos orgánicos (Hofmockel y Schlesinger 2007, Perotti *et al.* 1995). La relación C:N en todos los suelos estudiados era menor de 10, lo que puede reducir las tasas de fijación de N_2 .

Otro factor que no se tomó en consideración en este estudio y se ha determinado que puede limitar la fijación de N_2 por bacterias heterotróficas de vida libre, es la disponibilidad de Mo (Barron *et al.* 2009). Barron *et al.* (2009), sugiere que la limitación de molibdeno puede ser común en suelos ácidos del trópico y altamente meteorizados. Por lo tanto, todos estos factores limitantes deben ser estudiados para un mayor entendimiento del ciclo de N en el sistema agroforestal en Puerto Rico.

En base a los datos obtenidos se puede decir que se encontró menos variabilidad en la tasa de fijación de N_2 en los sistemas estudiados de lo que se ha encontrado en otros estudios. Además, se encontraron pocas diferencias significativas entre los sistemas de manejo lo que sugiere que la fertilización y/o alta degradación de los suelos bajo estudio sea un factor importante que afecta la fijación de N_2 . En adición, el historial de manejo de las fincas es uno de fertilización química y previos estudios sugieren una degradación de los micronutrientes disponibles en estos suelos. Esto sustenta los resultados observados de baja fijación de nitrógeno posiblemente a causa de la falta de micronutrientes, especialmente Mo.

6.2.5 Fijación total de nitrógeno

Los componentes estudiados en el sistema de café con sombra demostraron tener mayor capacidad de fijar N que los componentes en el sistema de café a sol. En el café con sombra se

fijó dos veces más N que en el café a sol en las localidades de Jayuya y Las Marías. En estas localidades se fijaron en promedio 59.67 g de N ha⁻¹ año⁻¹ en el café con sombra y 25.65 g de N ha⁻¹ año⁻¹ en el café a sol. En el bosque secundario se calculó un promedio de fijación de N de 2.8 µg de N m⁻² hora⁻¹, menor a lo reportado recientemente por Cusack *et al.* (2009), 95 a 120 µg de N m⁻² hora⁻¹, para bosques maduros de alta y baja elevación en Puerto Rico.

De los componentes estudiados el que demostró tener mayor capacidad de fijar N fue el suelo. Al igual que se ha encontrado en bosques templados del hemisferio norte donde se ha encontrado que la mayor fijación asimbiótica ocurre en el suelo, mientras que en bosques templados del hemisferio sur se ha encontrado que la mayor fijación asimbiótica de N ocurre en la hojarasca (Pérez *et al.* 2003). Sin embargo, en este estudio se pudo haber medido tanto fijación simbiótica como asimbiótica en el suelo. En el café con sombra de Jayuya no se pudo medir la fijación de N por unidad de área de líquenes y hojas ya que el agricultor cambió sus prácticas de manejo en esta área. A pesar de esto, la fijación de N obtenida en los líquenes y hojas no fue significativa.

6.3 Contenido de Nitrógeno en Hojas de Café

La concentración de N en las hojas de café varió de 2.61 a 3.39 % (Tabla 22). Estos valores se encuentran dentro de los niveles adecuados para el café (Conjunto Tecnológico para la Producción de Café 1999) y mayores a los encontrados en otros estudios de café con sombra (Aranguren *et al.* 1982, Alpizar *et al.* 1985). El contenido de N en las hojas de la localidad de Las Marías fue significativamente mayor en el cultivo de café con sombra que en el café a pleno sol. Resultados similares fueron obtenidos por Dossa *et al.* (2008), lo que sugiere una mejor nutrición de N para el café cultivado con sombra de *Inga*.

En las localidades de Jayuya y Lares no se pudieron observar diferencias en el contenido de N en las hojas del agrosistema a sol y con sombra ya que existen varios factores que pueden afectar el contenido de N en las plantas. El contenido de N puede variar a través del crecimiento de las plantas (Fahl *et al.* 1992, Quintero y Ataroff 1998), por el sistema de cultivo (Dossa *et al.*

2008) o nivel de irradiación (Seemann *et al.* 1987), por la época del año (Quintero y Ataroff 1998) y por el nivel de fertilización (Vicente-Chandler *et al.* 1968).

El contenido de N en la biomasa de las hojas de café varió de 27.79 a 50.48 kg de N ha⁻¹ (Tabla 22). En el agrosistema de café a sol en la localidad de Jayuya y Lares se observó mayor contenido de N debido a la mayor densidad de plantas que se encuentra en este sistema. En la localidad de Las Marías se observó mayor contenido de N en el agrosistema de café con sombra como se ha reportado en otros estudios con sombra de leguminosas. Aranguren *et al.* (1982) reportaron 61.7 kg de N ha⁻¹ para el cultivo de café con sombra. Alpizar *et al.* (1985), comparando dos sistemas de sombra, encontraron 46.2 kg de N ha⁻¹ en cultivos de café con laurel (árbol maderable) y 67.0 kg de N ha⁻¹ en cultivos de café con poró (leguminosa). Mientras que Quintero y Ataroff (1998) encontraron 110 kg de N ha⁻¹ contenido en las hojas de café a plena exposición solar. Los valores encontrados en los agrosistemas con sombra son menores a lo reportado por otros autores ya que la densidad de plantas en las fincas bajo estudio es menor a la de otros estudios. Si los agrosistemas de café con sombra se comportan como los de Las Marías éste podría aportar más N de su biomasa al sistema que el café sembrado a pleno sol. Además del N que puedan contener las plantas de café también los árboles de leguminosas pueden aportar de 340 kg de N ha⁻¹ (Alpizar *et al.* 1985) hasta 718 kg de N ha⁻¹ (Dossa *et al.* 2008) de su biomasa para aumentar así la capacidad de los agrosistemas de café con sombra de reciclar el N.

6.3.1 Contenido ¹⁵N en agrosistemas de café en Las Marías

El contenido de $\delta^{15}\text{N}$ encontrado en el árbol de leguminosa en el café, *Inga vera*, fue de 2.42. Este valor se aproxima a valores de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas no fijadoras y es mayor al valor encontrado en el árbol no fijador. En otros estudios se han encontrado valores desde 0.04 a 4.91 en diferentes especies del género *Inga* (Leblanc *et al.* 2005, Koponen *et al.* 2003, Roggy *et al.* 1999a). En estos estudios a pesar de que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para *Inga* spp. han sido mayores a los de árboles no fijadores han podido probar la fijación de N₂ potencial por otros métodos como concentración de N en la hoja, nodulación, actividad de la nitrogenasa y dilución de ¹⁵N. En este estudio se observó la presencia de nódulos en *Inga vera*. La actividad de la nitrogenasa en el

suelo del sistema de café con *Inga vera* fue mayor a la del sistema de café a sol. Por lo tanto, es posible que la *Inga vera* en este sistema esté fijando N₂.

El valor mayor de $\delta^{15}\text{N}$ en hojas de *Inga vera* que en *Guarea guidonia*, puede estar relacionado a diferencias en discriminación de ^{15}N en la asimilación de N, fijación de N₂, metabolismo de la planta, diferentes micorrizas (Högberg 1997, Handley y Raven 1992) en la *Inga* o por diferentes fuentes de N del suelo (Roggy *et al.* 1999a). El género *Inga* es heterogéneo taxonómicamente y ecológicamente (Lawrence *et al.* 1995), por lo que se puede afectar la confiabilidad de los estimados de ^{15}N (Högberg 1997, Handley y Raven 1992). Algunas especies de *Inga* resultan con un valor de $\delta^{15}\text{N}$ alto en las hojas (Koponen *et al.* 2003, Roggy *et al.* 1999a, Roggy *et al.* 1999b), por lo tanto, pueden tener un metabolismo de N que favorece el ^{15}N (Högberg 1997, Handley y Raven 1992) pero otras parecen no tener esta discriminación ya que presentan valores bajos de $\delta^{15}\text{N}$ típico de plantas fijadoras (Roggy *et al.* 1999b). Algunos estudios han encontrado que las hojas de *Inga edulis* tienen mayor porcentaje de $\delta^{15}\text{N}$ que raíces (Nygren y Leblanc 2009, Leblanc *et al.* 2009). Mientras otros estudios han encontrado valores similares de exceso del átomo ^{15}N en hojas, tallo y raíces de *Inga edulis* (Leblanc *et al.* 2007). Por lo tanto, se deben realizar más estudios de abundancia natural de ^{15}N en *Inga vera* en diferentes órganos del árbol, en diferentes tipos de suelo y con otras técnicas para comprobar la fijación de N₂ por esta especie.

El árbol no fijador, *Guarea guidonia*, es una especie nativa de Puerto Rico (Weaver 1988). Una razón para que el valor de $\delta^{15}\text{N}$ fuera más bajo en esta especie que en la *Inga vera* es la diferencia que puede existir en el consumo de NO₃ y NH₄ por esta especie. Turnbull *et al.* (1996) encontraron una gama de especies de árboles exhibiendo una preferencia marcada por consumo de amonio sobre nitrato en diferentes ecosistemas naturales en Australia. En el estudio de Roggy *et al.* (1999b) donde evaluaron diferentes especies de árboles fijadores y no fijadores, encontraron mucha variabilidad en el valor de $\delta^{15}\text{N}$ entre especies de árboles no fijadores. Otra posible explicación para el valor bajo de $\delta^{15}\text{N}$ en esta especie lo es la diferencia que puede haber de ^{15}N en el suelo de bosque y en el suelo de café con sombra. Vitousek *et al.* (1989) encontraron valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ en plantas control, no fijadoras, posiblemente por diferentes valores de

$\delta^{15}\text{N}$ encontrados en el suelo. Danso *et al.* (1992) citando a otros autores afirma que el $\delta^{15}\text{N}$ en ecosistemas naturales es usualmente menor que en suelos agrícolas. Por lo tanto, se debe evaluar la abundancia natural de ^{15}N en los suelos bajo estudio. Como también se debe evaluar la especie *G. guidonia* como árbol de referencia para estudios de abundancia natural de ^{15}N ya que éste es un árbol común en los bosques secundarios de Puerto Rico.

En un estudio evaluando la dinámica de ^{15}N en un cacaotal encontraron valores más bajos de $\delta^{15}\text{N}$ en raíces de plantas de cacao cerca de una especie fijadora de N_2 versus raíces de cacao sin contacto con la especie fijadora (Leblanc *et al.* 2009). De igual forma, en estudios con café se ha encontrado menor valor de ^{15}N en hojas de café cerca de árboles fijadores que en hojas de café lejos (Snoeck *et al.* 2000). Los resultados obtenidos en este estudio difieren de estos otros estudios ya que las hojas de café cerca de *I. vera* presentaron mayor porcentaje de ^{15}N que las hojas de café sin *I. vera*. Como ya se ha discutido, uno de los factores que pudo afectar el contenido de $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas es la variabilidad en ^{15}N que existe en diferentes tipos de suelo. Es posible que en sistemas agroforestales de café mayores de 5 a 7 años se afecten los valores de ^{15}N (Grossman *et al.* 2006). Por esta razón, Grossman *et al.* (2006) y Van Kessel *et al.* (1994) sugieren que el método de abundancia natural de ^{15}N no es adecuado para sistemas agroforestales bien establecidos (más de 6 años). Para llegar a estas conclusiones, en Puerto Rico se deben realizar otros estudios utilizando el método de abundancia natural de ^{15}N junto con otros métodos como reducción de acetileno y concentración de N total entre otros. En futuros estudios se deben muestrear más árboles y plantas de café y se debe evaluar el $\delta^{15}\text{N}$ en diferentes partes de las plantas y en el suelo.

6.4 Biomasa Aérea y Almacenamiento de Carbono

6.4.1 Biomasa y carbono almacenado en plantas de café

La biomasa aérea en las plantas de café varió de 6.02 a 10.59 toneladas hectárea⁻¹. El contenido promedio de C en la biomasa fue de 4.33 para el agrosistema de café a sol y 3.21 para

el agrosistema con sombra. Los valores en el agrosistema a sol son mayores debido a la alta densidad de plantas en estos sistemas a diferencia de los agrosistemas con sombra.

Estos valores se encuentran dentro del rango reportado en otros estudios realizados en diversos agroecosistemas de café. Polzot (2004) reportó biomasa de 2.9 a 7.0 toneladas hectérea⁻¹ y a su vez un almacenaje de C de 1.4 a 3.5 toneladas hectérea⁻¹ para el cultivo de café creciendo bajo diferentes tipos de sombra. Suárez Pascua (2002) encontró biomasa de 0.4 a 5.6 y almacenamiento de C de 0.2 a 2.8 toneladas hectérea⁻¹. Para Centroamérica Vaast (2005) reporta rangos de secuestro de carbono para cafetos de 4 a 10 ton de C ha⁻¹. Fournier (1996) reportó 8.4 toneladas de C ha⁻¹ en plantas de café creciendo bajo sombra de *Erythrina poeppigiana*, valores más altos a los encontrados en este y otros estudios.

6.4.2 Biomasa y carbono almacenado en árboles de sombra

Se encontró que los árboles de sombra para café pueden contener en su biomasa un promedio de 21.20 ton ha⁻¹ de C. Esta cifra es mayor al contenido de C que se ha encontrado en agrosistemas de café con *Inga sp.* solamente, donde se ha encontrado un contenido de C de 7.6 ton ha⁻¹ (Polzot 2004). Los valores de contenido de C de los árboles de sombra en Lares y Las Marías están más cercanos a las cifras encontradas en plantaciones de café con *Inga sp.* Sin embargo, el contenido de C en los árboles de sombra de Jayuya es aún mayor al encontrado en plantaciones de café con sombra diversificada (33.2 ton/ha) (Polzot 2004). En Jayuya se obtuvo un contenido mayor de C debido a que los árboles en esta finca tenían diámetros más grandes y mayor altura.

Polzot (2004) reportó contenido de C de 7.6 ton ha⁻¹ en agroecosistemas con árboles de *Inga sp.* mientras que en sistemas con sombra diversificada encontró valores mayores de 20. Kürsten y Burschel (1993) reportaron que los árboles de sombra en plantaciones agroforestales pueden almacenar de 3 a 25 toneladas de C ha⁻¹. Suárez Pascua (2002) también reportó valores de 1.9 a 17.5 ton de C ha⁻¹ en sistemas agroforestales con sombra de *Inga sp.* solamente. La capacidad de almacenamiento de los sistemas agroforestales va a depender de la densidad de

siembra, edad y especies y del uso previo de la tierra (Vaast 2005). Estos resultados confirman que a mayor número de árboles y tamaño aumenta el potencial de los agrosistemas de café con sombra como fuentes de secuestro de C.

6.4.3 Biomasa y carbono almacenado en sistemas de bosque secundario

En los sistemas de bosque estudiados se encontró un promedio de biomasa aérea y contenido de C de 85.33 y 42.83 ton ha⁻¹ respectivamente. En Costa Rica, la biomasa aérea total encontrada en un bosque secundario fue de 99.9 ton ha⁻¹ y la fijación de C de 46.4 ton ha⁻¹ (Chacón *et al.* 2007). Según Aide *et al.* (2000), la biomasa aérea para un bosque secundario en Puerto Rico después de 15 años de abandono se acerca a las 100 ton ha⁻¹. La secuestro de C equivalente para esta biomasa es de 50.0 ton ha⁻¹. Sin embargo, en Brazil se han encontrado valores de biomasa aérea total en bosques secundarios de 12 a 14 años de abandono de 128.1 ton ha⁻¹ equivalente a 64.05 ton ha⁻¹ de C almacenado (Feldpausch *et al.* 2004). Los valores de biomasa aérea y secuestro de C encontrados en el sistema de bosque secundario son más bajos pero se acercan a los encontrados en otros bosques de Costa Rica y Puerto Rico. Por lo tanto, los bosques utilizados en el estudio sirven como control para comparar la secuestro de C en los agrosistemas de café.

6.4.4 Carbono almacenado en suelo

La cantidad de carbono almacenado en el suelo varió de 25.7 a 56.4 ton de C ha⁻¹, encontrándose la mayor concentración de C en el suelo de bosque y la menor en el suelo del sistema de café a sol. La concentración de C encontrada en el suelo de bosque se acerca al promedio de contenido de C en suelos de bosques secundarios de 50 años en Puerto Rico, aproximadamente 62 ton de C ha⁻¹ (Brown y Lugo 1990). El contenido de C en los agrosistemas de café se acerca al contenido promedio de C en suelos de pasturas y áreas agrícolas, aproximadamente 25 ton de C ha⁻¹ (Brown y Lugo 1990). La cantidad de C que se encuentra en los suelos de Puerto Rico es menor a la de otros países continentales. Avila-Vargas (2000) encontró en Costa Rica de 108.63 a 184.43 ton de C ha⁻¹ en el suelo de diferentes sistemas

agroforestales, donde obtuvo el mayor almacenamiento en el suelo de café con *Erythrina*. En Nicaragua Suárez-Pascua (2002) encontró de 112 a 188 ton de C ha⁻¹, donde obtuvo el mayor contenido de C en sistemas con rangos de altura de menos de 5 m y sistemas de café con *Inga*. Mena-Mosquera (2008) también presenta un promedio de almacenamiento de C para diferentes agrosistemas dentro de estos rangos, 102 ton de C ha⁻¹. Además existen varios factores como composición mineral del suelo, textura, profundidad, densidad aparente y aireación que pueden afectar el secuestro de carbono en el suelo.

Si se compara el almacenamiento de C en la biomasa aérea y en el suelo, se puede observar que en el suelo se almacena mayor cantidad de C. Lal (2004) afirma que la cantidad de C en el suelo es 3.3 veces mayor a la de la atmósfera y 4.5 veces mayor a la biótica. En el único sistema donde es significativa la diferencia en contenido de C en el suelo y la biomasa aérea es en el sistema de café a sol, donde el contenido de C en el suelo es siete veces mayor al de la biomasa aérea. En los sistemas de café con sombra y bosque la diferencia no es significativa.

Si se observa el contenido de C total, en la biomasa aérea y en el suelo en los tres ecosistemas, se puede notar que en el bosque hay mayor almacenamiento de C que en los agrosistemas de café. Se puede observar que el contenido de C en el agrosistema de café con sombra es 1.6 veces mayor al contenido de C en el café a sol. Por lo tanto, los sistemas agroforestales de café tienen mayor capacidad de almacenar C en su biomasa y en el suelo que los sistemas agrícolas de café a pleno sol.

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El agrosistema de café con sombra tiene la capacidad de fijar mayor cantidad de N que el sistema de café a sol.
- Los agrosistemas de café a sol muestran tener mayor producción de café que los sistemas de café con sombra y por ende extraen mayor cantidad de N y nutrientes del sistema por lo que los insumos en este sistema deben ser mayores.
- La fijación de N₂ en la hojarasca fue consistentemente mayor en el ecosistema de bosque y no hubo diferencias significativas entre los dos agrosistemas de café en las tres localidades.
- En la filósfera de las plantas de café, no se encontraron diferencias significativas entre los agrosistemas de café a pleno sol y con sombra. Por lo tanto, la ausencia o presencia de sombra no afectó la fijación de N en este componente ni hubo variación entre los meses.
- En la fijación de N₂ por líquenes no se encontraron diferencias significativas entre ecosistemas ni entre los meses.
- La mayor fijación de N₂ se obtuvo en el suelo ya que en éste se obtuvo fijación tanto asimbiótica como simbiótica. En el agrosistema de café con sombra se obtuvo significativamente mayor fijación de N₂ en el suelo que en el agrosistema de café a sol en las localidades de Jayuya y Las Marías. No se encontraron diferencias significativas en fijación de N entre el suelo a 0.5 y 1.2 m de distancia de la *Inga*.
- La tasa de fijación de N₂ en los agrosistemas de café y bosque en Puerto Rico tiende a ser más baja y menos variable a la de otros sistemas inclusive sistemas tropicales comparables.
- Para futuros estudios en fijación de N₂, se deben evaluar los factores que afectan este proceso como disponibilidad de C, N, P y Mo en el suelo, humedad del suelo, contenido de lignina de la hojarasca y residuos orgánicos, respiración y tasa de descomposición.
- Debido a la alta variabilidad en la técnica de reducción de acetileno y los valores bajos encontrados en este estudio, futuros estudios que evalúen tasa de fijación de N₂ por medio de esta técnica, deben ser calibrados con la técnica de ¹⁵N para cada sistema que se examine.

- La tasa de fijación depende en gran medida de la masa microbiana activa en el sustrato del suelo. Un futuro proyecto debe analizar la masa microbiana activa en los diferentes agrosistemas.
- La biomasa aérea promedio en plantas de café a pleno sol fue de 8.65 ton ha⁻¹ conteniendo 4.33 ton de C ha⁻¹. En los sistemas de café con sombra la biomasa promedio fue 6.31 ton ha⁻¹ y el contenido de C en estas fue de 3.15 ton de C ha⁻¹. La biomasa aérea promedio en árboles de sombra fue 42.41 ton ha⁻¹ conteniendo 21.20 ton de C ha⁻¹.
- En el suelo se encontró mayor contenido de carbono que en la biomasa aérea. Este varió de 32.1 (en el sistema de café a pleno sol) a 50.8 ton ha⁻¹ (en el bosque). En total se encontró mayor contenido de C en el agrosistema de café con sombra (59.65 ton de C ha⁻¹) que en el sistema de café a pleno sol (36.42 ton de C ha⁻¹).
- Se encontró que los árboles en los sistemas agroforestales de café tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de C en su biomasa. La capacidad de los sistemas agroforestales de almacenar C va a depender de las especies de árboles, densidad a la que estén sembrados, altura y diámetro de éstos.

8 LITERATURA CITADA

Abruña, F., J. Vicente-Chandler, S. Silva y W. Gracia. 1965. Productivity of nine coffee varieties growing under intensive management in full sunlight and partial shade in the coffee region of Puerto Rico. *Journal of Agriculture University of Puerto Rico* 49: 244-253.

Aide, T. M., J. K. Zimmerman, J. B. Pascarella, L. Rivera y H. Marcano-Vega. 2000. Forest regeneration in a chronosequence of tropical abandoned pastures: implications for restoration ecology. *Restoration Ecology* 8: 328-338.

Albrecht, A., G. Cadisch, E. Blanchart, S. M. Sitompul y B. Vanlauwe. 2004. Below-ground inputs: Relationships with soil quality, soil C storage and soil structure. *En: van Noordwijk, M., G. Cadisch y C. K. Ong (Eds) Below-ground interactions in tropical agroecosystems: Concepts and models with multiple plant components.* CABI Publishing.

Alègre, C., 1959. Climates et caféiers d'Arabie. *Agron. Trop.* 14, 23-58.

Alpizar, L., H. W. Fassbender, J. Heuvelop, G. Enriquez y H. Fölster. 1985. Sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica*) con laurel (*Cordia alliodora*) y con poró (*Erythrina poeppigiana*) en Turrialba, Costa Rica. I. Biomasa y reservas nutritivas. *Turrialba* 35: 233-242.

Alvarado, J., E. López de León y M. Medina. 1999. Cuantificación estimada del dióxido de carbono fijado por el agroecosistema café en Guatemala. *Boletín PROMECAFE* No. 81: 7-14.

Andrews, J. H. y S. S. Hirano (Eds). 1991. *Microbial ecology of leaves.* Springer, Berlin Heidelberg New York.

Arango, M. 2007. Zonificación agroecológica y composición de especies presentes en el agroecosistema cafetero de Puerto Rico. Tesis M.S: Depto. Agronomía y Suelos, Universidad de Puerto Rico. 124 p.

Aranguren, J., G. Escalante y R. Herrera. 1982. Nitrogen cycle of tropical perennial crops under shade trees. I. Coffee. *Plant and Soil* 67: 247-258.

Avila-Vargas, G. 2000. Fijación y almacenamiento de carbono en sistemas de café bajo sombra, café a pleno sol, sistemas silvopastoriles y pasturas a pleno sol. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Babbar, L. y D. R. Zak. 1994. Nitrogen cycling in coffee agrosystems: net N mineralization and nitrification in the presence and absence of shade trees. *Agricultural Ecosystems and Environment.* 48: 107-113.

- Babbar, L. I. y D. R. Zak. 1995. Nitrogen loss from coffee agroecosystems in Costa Rica: leaching and denitrification in the presence and absence of shade trees. *Journal of Environmental Quality*. 24:227-233.
- Baca, B. E., L. Soto-Urzuía y M. P. A. Pardo-Ruiz. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos* 38: 43-49.
- Barkmann, J. y C. R. Schwintzer. 1998. Rapid N₂ fixation in pines? Results of a Maine field study. *Ecology* 79: 1453-1457.
- Barron, A. R., N. Wurzburger, J. P. Bellenger, S. J. Wright, A. M. L. Kraepiel y L. O. Hedin. 2009. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nature Geoscience* 2: 42-45.
- Beer, J., R. Muschler, D. Kass y Somarriba, E. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems* 38:139-164.
- Beinroth, F., Engel, R., Lugo, J., Santiago, C., Rios, S. y Brannon, G. 2003. Updated Taxonomic Classification of the Soils of Puerto Rico, 2002. Estación Experimental Agrícola, Recinto de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. Boletín 303. 77 p.
- Benner, J. W., S. Conroy, C. K. Lunch, N. Toyoda y P. M. Vitousek. 2007. Phosphorus fertilization increases the abundance and nitrogenase activity of the cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian Montane Forests. *Biotropica* 39 (3): 400-405.
- Bentley, B. L. 1987. Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74: 234-241.
- Bentley, B. L. y E. J. Carpenter. 1984. Direct transfer of newly-fixed nitrogen from free-living epiphyllous microorganisms to their host plant. *Oecologia* 63: 52-56.
- Bergad, L. W. 1983. Coffee and the growth of agrarian capitalism in nineteenth-century Puerto Rico. Princeton: Princeton University Press. 242p.
- Bertin, C., X. Yang y L. A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256: 67-83.
- Boddey, R. M., O. C. de Oliveira, S. Urquiaga, V. M. Reis, F. L. de Olivares, V. L. D. Baldani y J. Döbereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil* 174: 195-209.
- Bonfante, P. y S. Perotto. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3-21

- Boring, L. R., W. T. Swank, J. B. Waide y G. S. Henderson. 1988. Sources, fates, and impacts of nitrogen inputs to terrestrial ecosystems: Review and synthesis. *Biogeochemistry* 6: 119-159.
- Bornemisza E. 1982. Nitrogen cycling in coffee plantations. *Plant and Soil* 67: 241- 247.
- Brimecombe, M. J., F. A. De Leij y J. M. Lynch. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. *En: Pinton, R., Z. Varanini y P. Nannipieri. The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, Inc. New York, USA pp. 95-140.*
- Brown, S. 1997. Estimating biomass and biomass change of tropical forests. A Primer. FAO – Forestry Paper 134. A Forest Resource Assessment Publication. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Brown, S. y A. E. Lugo. 1984. Biomass of tropical forest: a new estimate based on forest volumes. *Science* 223: 1290-1293.
- Brown, S. y A. E. Lugo. 1990. Effects of forest clearing and succession on Carbon and Nitrogen content of soils in Puerto Rico and the U. S. Virgin Islands. *Plant and Soil* 124: 53-64.
- Burgoyne, T. A. 2007. Free living nitrogen-fixation in ponderosa pine/Douglas-fir forests of western Montana. Tesis de Maestría University of Wisconsin, Madison. 90 pp.
- Cairns, M. y R. Meganck. 1994. Carbon sequestration, biological diversity and sustainable development: Integrated forest management. *Environmental Management* 18: 13-22.
- Chacón, P., H. A. Leblanc y R. O. Russo. 2007. Fijación de carbono en un bosque secundario de la región tropical húmeda de Costa Rica. *Tierra Tropical* 3: 1-11.
- Cleveland, C. C., A. R. Townsend, D. S. Schimel, H. Fischer, R. W. Howarth, L. O. Hedin, S. S. Perakis, E. F. Latty, J. C. V. Fisher, A. Elseroad y M. F. Wasson. 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 623-645.
- Conjunto Tecnológico para la Producción de Café en Puerto Rico. 1999. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. Colegio de Ciencias Agrícolas. Estación Experimental Agrícola, Río Piedras, Puerto Rico. Publicación 104, 29pp.
- Crews, T. E., L. M., Kurina y P. M. Vitousek. 2001. Organic matter and nitrogen accumulation and nitrogen fixation during early ecosystem development in Hawaii. *Biogeochemistry* 52: 259-279.

- Crews, T. E., H. Farrington y P. M. Vitousek. 2000. Changes in asymbiotic, heterotrophic, nitrogen fixation on leaf litter of *Metrosideros polymorpha* with long-term ecosystem development in Hawaii. *Ecosystems* 3: 386-395.
- Cusack, D., W. Silver y W. McDowell. 2009. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: Ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. *Ecosystems* 12: 1299-1315.
- Dale, V.H. 1997. The relationship between land-use change and climate change. *Ecological Applications* 7(3): 753-769.
- Danso, S. K. A., G. D. Bowen y N. Sanginga. 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agroecosystems. *Plant and Soil* 141: 177-196.
- Danso S. K. A., G. Hardarson y F. Zapata. 1986. Assessment of dinitrogen fixation potentials of forage legumes with ¹⁵N technique. *En Proceedings of a Workshop on Potentials of Forage Legumes in Farming Systems of Sub-Saharan Africa*. Eds. Haque, I., S. Jutzi and P. J. H. Neate. pp 26-57. ILCA, Addis Ababa, Ethiopia.
- Danso S. K. A., G. Hardarson y F. Zapata. 1993. Misconceptions and practical problems in the use of ¹⁵N soil enrichment techniques for estimating N₂ fixation. *Plant and Soil* 152: 25-52.
- DaMatta, F. M. 2004. Ecophysiological constraints on the production of shade and unshade coffee: a review. *Field Crops Research* 86: 99-114.
- DiStefano, J. F. y H. L. Gholz. 1989. Non-symbiotic biological dinitrogen fixation (acetylene reduction) in an age sequence of slash pine plantations in North Florida. *Forest Science* 35: 863-869.
- Döbereiner, J. y F. O. Pedrosa. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Springer-Verlag, Berlin, 155 pp.
- Dossa, E. L., E. C. M. Fernandes, W. S. Reid y K. Ezui. 2008. Above- and belowground biomass, nutrient and carbon stocks contrasting an open-grown and a shaded coffee plantation. *Agroforestry Systems* 72: 103-115.
- Eisele, K. A., D. S. Schimel, L. A. Kapustka y W. J. Parton. 1989. Effects of available P and N:P ratios on non-symbiotic dinitrogen fixation in tallgrass prairie soils. *Oecologia* 79: 471-474.
- Escalante, G., R. Herrera y J. Aranguren. 1984. N₂ fixation in shade tres (*Erythrina poeppigiana*) in cacao plantations in North Venezuela. *Pesq. Agropec. Bras.* 19: 223-230.
- Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales y J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2790-2798

Fagg, M. 2003. Nitrogen fixation. Australian National Botanic Gardens, Australian Government Department of the Environment and Water Resources.
<http://www.anbg.gov.au/cryptogams/underworld/panel-12/index.html>

Fahl, J. I., M. L. C. Carelli y A. C. Magalhães. 1992. Asimilación de carbono y nitrógeno en hojas de café. Turrialba 42: 523-527.

Fahl, J. I., M. L. C. Carelli, J. Vega y A. C. Magalhães. 1994. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). Journal of Horticultural Science 69: 161-169.

Favilli, F. y A. Messini. 1990. Nitrogen fixation at phyllospheric level in coniferous plants in Italy. Plant and Soil 128: 91-95.

Feldpausch, T., M. Rondon, E. Fernandes, S. Riha y E. Wandelli. 2004. Carbon and nutrient accumulation in secondary forests regenerating on pastures in Central Amazonia. Ecological Applications 14. Suplemento 2004: 164-176.

Féliz, D. A. 2003. Incidencia de la broca (*Hypothenemus hampei* Ferr. 1867) y sus controladores naturales en plantas de café bajo diferentes tipos de sombra en San Marcos, Nicaragua. Thesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Forman, R. T. T. 1975. Canopy lichens with blue-green algae: A nitrogen source in a Colombian rain forest. Ecology 56: 1176-1184.

Foss, J. E., F. R. Moormann y S. Rieger. 1983. Inceptisols. *En*: Wilding, L.P, Smeck, N.E., Hall, G.F. Pedogenesis and soil taxonomy. II The soil orders. Developments in Soil Science 11B. Elsevier. 410p.

Fournier, L. 1996. Fijación de carbono y diversidad biológica en el agroecosistema cafetero. Boletín PROMECAFE, No. 71: 7-13.

Frangi, J. L. y A. E. Lugo. 1985. Ecosystem dynamics of a subtropical floodplain forest. Ecological Monographs. 55:351-369.

Freiberg, E. 1998. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. Oecologia 117: 9-18.

Fürnkranz, M., W. Wanek, A. Richter, G. Abell, F. Rasche y A. Sessitsch. 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. ISME Journal 2: 561-570.

Gajendiran, N. y A. Mahadevan. 1989. Nitrogenase activity associated with leaf, root, and rhizosphere soils in an Indian tropical forest. Biology and Fertility of Soils 8: 71-74.

Galloway, J. 1998. The global nitrogen cycle: Changes and consequences. *Environ. Pollut.* 102: 15-24.

Giller, K. E. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2nd ed. CAB International, Wallingford, UK, 423pp.

Granhall, V. y T. Lindberg. 1980. Nitrogen input through biological nitrogen fixation. *Ecological Bulletin* 32: 333-342.

Grant, D. y D. Binkley. 1987. Rates of free-living nitrogen fixation in some Piedmont forest types. *Forest Science* 33: 548-551.

Grossman, J. M., C. Sheaffer, D. Wyse, B. Bucciarelli, C. Vance y P. H. Graham. 2006. An assessment of nodulation and nitrogen fixation in inoculated *Inga oerstediana*, a nitrogen-fixing tree shading organically grown coffee in Chiapas, Mexico. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 769-784.

Haarer, A. E. 1958. *Modern Coffee Production*. Leonard Hill, London.

Handley, L. L. y J. A. Raven. 1992. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant, Cell and Environment* 15: 965-985.

Hardy, R. W. F., R. C. Burns y R. D. Holsten. 1973. Applications of the Acetylene-Ethylene Assay for Measurement of Nitrogen Fixation. *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 5: 47-81.

Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson y R. C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.

Harmand, J. M., H. Ávila, E. Dambrine, U. Skiba, S. de Miguel, R. V. Renderos, R. Oliver, F. Jiménez y J. Beer. 2007a. Nitrogen dynamics and soil nitrate retention in a *Coffea arabica*-*Eucalyptus deglupta* agroforestry system in Southern Costa Rica. *Biogeochemistry*. 85: 125-139.

Harmand, J. M., V. Chaves, P. Cannavo, H. Ávila, L. Dionisio, B. Zeller, K. Hergoula'ch, P. Vaast, R. Oliver, J. Beer, y E. Dambrine. 2007b. Nitrogen dynamics (coffee productivity, nitrate leaching and N₂O emissions) in *Coffea arabica* systems in Costa Rica according to edaphic conditions, fertilization and shade management. *En "2nd International Symposium on Multi-Strata Agroforestry Systems with Perennial Crops"* (CIRAD, ed.), CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Heath, B., P. Sollins, D. A. Perry y K. Cromack Jr. 1988. Asymbiotic nitrogen fixation in litter from Pacific Northwest forests. *Canadian Journal of Forest Research* 18: 68-74.

Hendrickson, O. Q. 1990. Asymbiotic nitrogen fixation and soil metabolism in three Ontario forests. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 967-971.

- Hicks, W. T., M. E. Harmon y R. P. Griffiths. 2003. Abiotic controls on nitrogen fixation and respiration in selected woody debris from the Pacific Northwest, U.S.A. *Ecoscience* 10: 66-73.
- Hill, D. 2001. Lichens and co-ordination of the symbionts. *Microbiology Today* 28:124-137.
- Hofmockel, K. S. y W. H. Schlesinger. 2007. Carbon dioxide effects on heterotrophic dinitrogen fixation in a temperate pine forest. *Soil Biology and Biochemistry* 71: 140-144.
- Högberg, P. 1997. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* 137: 179-203.
- Högberg, P. y M. Kvarnstrom. 1982. Nitrogen fixation by the woody legume *Leucaena leucocephala*. *Plant Soil* 66: 21-28.
- Holdridge, L. 1996. *Ecología basada en zonas de vida*. IICA. San Jose, Costa Rica. 216p.
- Houghton, R. A. 2003. Revised estimates of the annual net flux of carbon to the atmosphere from changes in land use and land management 1850-2000. *Tellus* 55B: 378-390.
- Ingram, J. S. I. y E. C. M. Fernandes. 2001. Managing carbon sequestration in soils: concepts and terminology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 87: 111-117.
- IPCC. 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.
- Jackson, R. B., H. J. Schenk, E. G. Jobbágy, J. Canadell, G. D. Colello, R. E. Dickinson, C. B. Field, P. Friedlingstein, M. Heimann, K. Hibbard, D. W. Kicklighter, A. Kleidon, R. P. Neilson, W. J. Parton, O. E. Sala y M. T. Sykes. 2000. Belowground consequences of vegetation change and their treatment in models. *Ecological Applications* 10: 470-483.
- James, E. K. 2000. Nitrogen Fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197-209.
- Jimenez-Salgado, T., L. E. Fuentes-Ramírez, A. Tapia-Hernández, M. A. Mascarua-Esparza, E. Martínez-Romero y J. Caballero-Mellado. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3676-3683.
- Jobbágy, E. G. y R. B. Jackson. 2000. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications* 10: 423-436.

Jones, C. G. y M. Shachak. 1990. Fertilization of the desert soil by rock-eating snails. *Nature* 346: 839 – 84.

Jones, D. L. J. Farrar y K. E. Giller. 2003. Associative nitrogen fixation and root exudation: What is theoretically possible in the rhizosphere? *Symbiosis* 35: 19-38.

Jones, K. 1982. Nitrogen fixing bacteria in the canopy of temperate forest trees: A re-examination. *Annals of Botany* 50: 329-334.

Jones, K. y D. Bangs. 1985. Nitrogen fixation by free living heterotrophic bacteria in an oak forest: The effect of liming. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 705-709.

Jurgensen, M. F., J. R. Tonn, R. T. Graham, A. E. Harvey y K. Geier-Hayes. 1991. Nitrogen fixation in forest soils of the inland Northwest. *En: Harvey, A. E.; Neuenschwander, L. F., (compilers). Proceedings Symposium on Management and Productivity of Western-Montane Forest Soils, 1990 April 10-12; Boise, ID. Gen. Tech. Rep. INT-280. Ogden UT: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain Research Station. 254 p.*

Knowles, R. 1980. Nitrogen fixation in natural plant communities and soils. *En: Bergersen, F. J. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, Ltd.*

Knowles, R., D. Biesboer, J. Pastor, M. Russelle y J. Snyder. 2004. *Peltigera*, a genus of nitrogen-fixing, terricolous lichens: Its contribution of nitrogen to forest soils of Northern Minnesota [abstract]. 3rd Annual Forest and Wildlife Research Review. Paper No. 26. Annual Forest and Wildlife Research Review.

Koponen, P., P. Nygren, A. M. Domenach, C. Le Roux, E. Saur y J. C. Roggy. 2003. Nodulation and dinitrogen fixation of legume trees in a tropical freshwater swamp forest in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology* 19: 655- 666.

Kumar, D. y L. L. Tieszen. 1980. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture* 16: 13-19.

Kumari, S. M. P. y A. Balasubramanian. 1993. Effect of combined inoculation of VAM and *Azospirillum* on the growth and nutrient uptake by coffee seedlings. *Indian Coffee* 57: 5-11.

Kurina, L. M. y P. M. Vitousek. 2001. Nitrogen fixation rates of *Stereocaulon vulcani* on young Hawaiian lava flows. *Biogeochemistry* 55: 179-194.

Kürsten, E. y P. Burschel. 1993. CO₂ mitigation by agroforestry. *Water, Air and Soil Pollution* 70: 533-544.

- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304: 1623-1627.
- Lawrence, A., T. D. Pennington, M. R. Hands, y R. A. Zúniga. 1995. Inga: high diversity in the neotropics. En: *Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils*. Eds. Evans, D. O. y L. T. Szott. pp. 130–141. Nitrogen Fixing Tree Research Reports, Special Issue.
- Leblanc, H. A., C. García, A. Yépez y P. Nygren. 2009. Dinámica del ^{15}N en un cacaotal orgánico de la región atlántica de Costa Rica. *Tierra Tropical* 5: 91-101.
- Leblanc, H. A., R. L. McGraw, P. Nygren. 2007. Dinitrogen-fixation by three neotropical agroforestry tree species under semi-controlled field conditions. *Plant and Soil* 291: 199-209.
- Leblanc, H. A., P. Nygren y R. L. McGraw. 2006. Green mulch decomposition and nitrogen release from leaves of two *Inga* spp. in an organic alley-cropping practice in the humid tropics. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 349-358.
- Leblanc, H. A., R. L. McGraw, P. Nygren y C. Le Roux. 2005. Neotropical legume tree *Inga edulis* forms N_2 -fixing symbiosis with fast-growing *Bradyrhizobium* strains. *Plant and Soil* 275: 123-133.
- Liengen, T. y R. A. Olsen. 1997. Nitrogen fixation by free-living cyanobacteria from different coastal sites in a high arctic tundra, Spitsbergen. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 29: 470–477.
- Limmer C. y H. L. Drake. 1996. Non-symbiotic N_2 -fixation in acidic and pH-neutral forest soils: Aerobic and anaerobic differentials. *Soil Biology and Biochemistry* 28: 177.
- López, G. 2008. Mineralización de nitrógeno en suelos bajo agrosistemas de producción de café (*Coffea arabica* L.) en Puerto Rico. Tesis M. S. Departamento Agronomía y Suelos, Universidad de Puerto Rico. 120 p.
- MacDicken, K. G. y N. T. Vergara. Introduction to agroforestry. En: MacDicken, K. G. y N. T. Vergara (Eds.), *Agroforestry: Classification and management*. John Wiley & Sons, New York, pp. 1-30.
- Maestri, M. y R. S. Barros. 1977. Coffee. En: Alvim, P.T., Kozlowski, T.T. (Eds.), *Ecophysiology of Tropical Crops*. Academic Press, New York, pp. 249–278.
- Maestri M., y R. Santos. 1987. *Ecofisiología de cultivos tropicales. Café. Programa cooperativo para la protección y modernización de la caficultura en México, Centro América y Panamá*. Promecafe. IICA. 50 p.

- Mafongoya, P. M., K. E. Giller, D. Odee, S. Gathumbi, S. K. Ndufa y S. M. Sitompul. 2004. Benefiting from N₂-Fixation and managing Rhizobia. *En: van Noordwijk, M., G. Cadisch y C. K. Ong (Eds.) Below-ground interactions in tropical agroecosystems: Concepts and models with multiple plant components.*
- Matzek, V. y P. M. Vitousek. 2003. Nitrogen fixation in bryophytes, lichens and decaying Wood along a soil-age gradient in Hawaiian montane rain forest. *Biotropica* 35: 12-19.
- Mena-Mosquera V. E. 2008. Relación entre el carbono almacenado en la biomasa total y la composición fisionómica de la vegetación en los sistemas agroforestales con café y en bosques secundarios del Corredor Biológico Volcánica Central- Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Menge, D. N. L. y L. O. Hedin. 2009. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120,000-year chronosequence in New Zealand. *Ecology* 90: 2190-2201.
- Millbank, J. W. 1978. The contribution of nitrogen fixing lichens to the nitrogen status of their environment. *En: U. Granhall (Ed.) Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria Ecol. Bull. (Stockholm)* 26: 260-265.
- Millbank, J. W. 1981. The assessment of nitrogen fixation and throughput by lichens: I. The use of a controlled environment chamber to relate acetylene reduction estimates to nitrogen fixation. *New Phytologist* 89: 647-655.
- Miller, B. J. 1983. Ultisols. *En Wilding, L.P, Smeck, N.E., Hall, G.F. Pedogenesis and soil taxonomy. II The soil orders. Developments in Soil Science* 11B. Elsevier. 410p.
- Mogollón, J.P., J. García-Miragaya, L. F. Sánchez, N. Chacón, y J. Araujo. 1997. Nitrógeno potencialmente disponible en suelos de cafetales bajo diferentes árboles de sombra. *Agronomía Tropical*. 47:87-102.
- Moguel, P y V. M. Toledo. 1999. Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. *Conservation Biology* 13: 11-21.
- Monroig-Inlgés, M. F. 2001. Manual para una caficultura sostenible en Puerto Rico. UPR, RUM, Servicio de Extensión Agrícola, SARE, 55 pp.
- Monroig-Inglés, M. F. 1997. La sombra en el cafetal: Debatible, controversial, sustentable... Servicio de Extensión Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez Colegio de Ciencias Agrícolas.

- Montenegro Gracia, E.J. 2005. Efecto del aporte de nutrientes de la biomasa de tres tipos de árboles de sombra en sistemas de manejo de café orgánico y convencional. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 67p.
- Müller, A., M. F. Schmitz y F. Bermúdez de Castro. 1989. Estudios previos sobre la contribución de líquenes epifíticos a la producción de robledales. *Options Méditerranéennes – Série Séminaires* 3: 203-205.
- Muñiz-Torres O. y M. Monroig-Ingles. 1994. Región cafetalera de Puerto Rico: Características y manejo de los suelos. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. Colegio de Ciencias Agrícolas. Servicio de Extensión Agrícola. Puerto Rico. 17 p.
- Murty, M. G. 1983. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in the phyllosphere of some economically important plants. *Plant and Soil* 73: 151-153.
- Muschler, R. 2001. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. *Agroforestry Systems* 51: 131-139.
- Nair, P. K. R. 1993. An introduction to agroforestry. Kluwer Academic Publishers. 499 pp.
- Newton, W. E. 2000. Nitrogen fixation in perspective. In: Pedrosa, F., M. Hungria, G. Yates y W. Newton (eds.) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Kluwer, Dordrecht, pp. 3-8.
- Nohrstedt, H. O. 1983. Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in soil: effect of water content and nitrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 275-279.
- Nunes, M.A., J.F. Bierhuizen y C. Ploegman. 1968. Studies on productivity of coffee. I. Effect of light, temperature and CO₂ concentration on photosynthesis of *Coffea arabica*. *Acta Botánica Neerlandica* 17: 93–102.
- Nygren, P. y H. A. Leblanc. 2009. Natural abundance of ¹⁵N in two cacao plantations with legume and non-legume shade trees. *Agroforestry Systems* 76: 303-315.
- O’Connell, A. M. y T. S. Grove. 1987. Seasonal variation in C₂H₂ reduction (N₂-fixation) in the litter layer of eucalypt forests of south-western Australia. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 135-142.
- Odum, E. P. 1971. *Principles of Ecology*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. 574 pp.

Oficina Internacional de las Repúblicas Americanas. 1902. El café: historia, cultivo, beneficio, variedades, producción, exportación, importación, consumo, etc., etc. Datos extensos resentados al Congreso Relativo al Café que se reunirá en Nueva York el 1 de octubre de 1902. Washington, D. C.

Okon, Y. y C. A. Labandera-Gonzalez. 1994. Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world wide field inoculation experiments. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1591-1601.

Ortiz-Ceballos. G. 2004. El Agroecosistema Café: Crisis de Mercado y Sustentabilidad. Tesis de Doctorado en Ciencias, Programa en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Posgraduados, Campus Veracruz. México. 125 p.

Paul, E. A. y F. E. Clark. 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Oxford, pag. 221.

Peeters, L. Y. K., L. Soto-Pinto, H. Perales, G. Montoya y M. Ishiki. 2003. Coffee production, timber, and firewood in traditional and *Inga*-shaded plantations in Southern Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 95: 481-493.

Peoples, M. B. 1993. Techniques for quantifying nitrogen fixation. *En*: Anderson, J. M. y J. S. I. Ingram. *Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods*. 2nd edition. C. A. B. International. Wallingford, UK. pp: 164-171.

Peoples, M. B., A. W. Faizah, B. Rerkasem y D. F. Herridge. 1989. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. *ACIAR Monograph No. 11*, vii + 76p.

Peoples, M. B., D. F. Herridge y J. K. Ladha. 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil* 174: 3-28.

Pérez, C. A., M. R. Carmona y J. J. Armesto. 2003. Non-symbiotic nitrogen fixation, net nitrogen mineralization and denitrification in evergreen forests of Chiloé Island, Chile: A comparison with other temperate forests. *Gayana Botanica* 60: 25-33.

Perfecto, I., A. R. Rice, R. Greenberg y M. Van der Voort. 1996. Shade Coffee: A disappearing refuge for biodiversity. *Bioscience* 46: 598-608.

Perotti, E. B. R., G. Chapo y A. Pidello. 1995. Actividad nitrogenasa en relación con el carbono disponible y el nitrógeno inorgánico en un argiudol. *Ciencia del Suelo* 13: 11-15.

Philippot, L. y J. C. Germon. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. *En* Buscot, F. y A. Varma (Eds.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*, Springer-Verlag, Berlin. 159-172p.

- Piao, Z., Z. Cui, B. Yin, J. Hu, C. Zhou, G. Xie, B. Su y S. Yin. 2005. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. *Biology and Fertility of Soils* 41: 371-378.
- Polzot, C. L. 2004. Carbon storage in coffee agroecosystems of southern Costa Rica: Potential applications for the Clean Development Mechanism. Thesis, Faculty of Environmental Studies, Master in Environmental Studies, York University, Toronto, Ontario, Canada. 149 p.
- Quintero, J. S. y M. Ataroff. 1998. Contenido y flujos de nitrógeno en la biomasa y hojarasca de un cafetal a plena exposición solar en Los Andes venezolanos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15: 501-514.
- Raimam, M. P., U. Albino, M. F. Cruz, G. M. Lovato, F. Spago, T. P. Ferracin, D.S. Lima, T. Goulart, C. M. Bernardi, M. Miyauchi, M. A. Nogueira y G. Andrade. 2007. Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). *Applied Soil Ecology* 35: 25-34.
- Reed, S. C., C. C. Cleveland y A. R. Townsend. 2007. Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. *Biotropica* 39: 585-592.
- Rice, R. A. y J. R. Ward. 1996. Coffee, conservation, and commerce in the western hemisphere. Smithsonian Migratory Bird Center, Washington, D. C. 40p.
- Rivera, R. 1993. Metodología para calcular los requerimientos nutricionales del cafeto. *Cultivos Tropicales* 14: 28-34.
- Roggy, J. C., M. F. Prévost, J. Garbaye y A. M. Domenach. 1999a. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using $\delta^{15}\text{N}$. *Journal of Tropical Ecology* 15: 1-22.
- Roggy, J. C., M. F. Prévost, F. Gourbiere, H. Casabianca, J. Garabaye y A. M. Domenach. 1999b. Leaf natural ^{15}N abundance and total N concentration as potential indicators of plant N nutrition in legumes and pioneer species in a rain forest of French Guiana. *Oecologia* 120: 171-182.
- Romero-Alvarado, Y., L. Soto-Pinto, L. García-Barrios y J. F. Barrera-Gaytán. 2002. Coffee yields and soil nutrients under the shades of *Inga* sp. vs. multiple species in Chiapas, Mexico. *Agroforestry Systems* 54: 215-224.
- Romero-López, S.A. 2006. Aporte de biomasa y reciclaje de nutrientes en seis sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica* var. Caturra), con tres niveles de manejo. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

- Roskoski, J. P. 1980a. Nitrogen fixation (C_2H_2 Reduction) by epiphylls on Coffee, *Coffea arabica*. *Microbial Ecology* 6: 349-355.
- Roskoski, J. P. 1980b. Nitrogen fixation in hardwood forests of the northeastern United States. *Plant and Soil* 54: 33-44.
- Roskoski, J. P. 1981. Nodulation and N_2 -fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations. I. Measurements of nodule biomass and field C_2H_2 reduction rates. *Plant and Soil* 59: 201-206.
- Roskoski, J. P. 1982. Nitrogen fixation in a Mexican coffee plantation. *Plant and Soil* 67: 283-291.
- Ruinen, J. 1961. The phyllosphere: I. An ecologically neglected milieu. *Plant and Soil* 15: 81-109.
- Ruinen, J. 1965. The phyllosphere: III. Nitrogen fixation in the phyllosphere. *Plant and Soil* 22: 375-394.
- Ruinen, J. 1974. Nitrogen fixation in the phyllosphere. En Quispel A (Ed.). *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam: North Holland Pub. Co.
- Sadeghiankh-Khalajabadi, S., B. Mejía-Muñoz y J. Arcila-Pulgarín. 2006. Composición elemental de nutrientes por la cosecha en la zona cafetera de Colombia. *Cenicafé* 57: 251-261.
- Sadowsky, M. J. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. *En: Werner, D. y W. E. Newton (Eds.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. pp. 89-112. Springer, Netherlands.
- Saxena, A. K., R. Shende y K. V. B. R. Tilak. 2002. Interaction of arbuscular mycorrhiza with nitrogen-fixing bacteria. *En: Sharma, A. K. y B. N. Johri. Arbuscular Mycorrhizae: Interactions in Plants, Rhizosphere and Soils*. Science Publishers New Hampshire, USA pp. 47-68.
- Saxena, A. K., S. K. Rathi y K. V. B. R. Tilak. 1997. Differential effect of various endomycorrhizal fungi on nodulating ability of green gram by *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) strain S 24. *Biology and Fertility of Soils* 24: 175-178.
- Scatena, F. N., W. L. Silver, T. Siccama, A. Johnson y M. J. Sanchez. 1993. Biomass and nutrient content of the Bisley Experimental Watershed, Luquillo experimental Forest, Puerto Rico, before and after hurricane Hugo, 1989. *Biotropica* 25:15-27.

- Seemann, J. R., T. D. Sharkey, J. L. Wang y C. B. Osmond. 1987. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. *Plant Physiology* 84: 796-802.
- Segura, M., M. Kanninen y D. Suárez. 2006. Allometric models for estimating aboveground biomass of shade trees and coffee bushes grown together. *Agroforestry Systems* 68: 143-150.
- Servicio de Extensión Agrícola. 1987. Increasing coffee production: impact study. University of Puerto Rico Mayaguez Campus College of Agricultural Sciences. 46p.
- Silvester, W. B. 1989. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Pacific Northwest America. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 283-289.
- Singh, U., N. L. Jat y A. C. Shivran. 2003. Effect of inoculation and levels of nitrogen on growth and yield of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Annals of Agricultural Research* 24: 172-174.
- Smith, D. W. 1983. Nitrogen fixation. En: Burns, R. G. y J. Howard. *Experimental microbial ecology*. Blackwell Scientific Publication. London, Great Britain. pp: 212-220.
- Smith, R. L. 1996. *Ecology and Field Biology*. Fifth Edition. Addison-Wesley Educational Publishers, Inc. USA.
- Smith, V. H. 1992. Effects of nitrogen: phosphorus supply ratios on nitrogen fixation in agricultural and pastoral ecosystems. *Biogeochemistry* 18 (1): 19-35.
- Snoeck, D., F. Zapata y A. M. Domenach. 2000. Isotopic evidence of the transfer of nitrogen fixed by legumes to coffee trees. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 4: 95-100.
- Soil Survey Staff. 1975. *Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. US Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Agric. Handbook No. 436. U. S. Govt. Printing Office, Washington, D.C., 574 pp.
- Soil Survey Staff. 2003. *Key to Soil Taxonomy*. Ninth Edition: U.S. Dept. Agr. Soil Conserv. Serv., Washington, 331 p.
- Somarriba, E., C. A. Harvey, M. Samper, F. Anthony, J. González, C. Staver y R. A. Rice. 2006. Biodiversity conservation in neotropical coffee (*Coffea arabica*) plantations. En: G. Schroth, G. A. B. da Fonseca, C. A. Harvey, C. Gascon, H. L. Vasconcelos y A. N. Izac (eds.) *Agroforestry and Biodiversity Conservation in Tropical Landscapes*. 199-226p.
- Son, Y. 2001. Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystems. *Ecological Research* 16: 183-196.

- Soto-Pinto, L., I. Perfecto, J. Castillo-Hernández y J. Caballero-Nieto. 2000. Shade effect on coffee production at the northern Tzeltal zone of the state of Chiapas, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 80: 61-69.
- Sprent, J. I. y R. Parsons. 2000. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research* 65: 183-196.
- Sprent, J. I. y P. Sprent. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms*. Chapman and Hall, London.
- Steiman, S. R., H. C. Bittenbender, T. W. Idol, L. D. Gautz y M. C. Jackson. 2006. Shade coffee in Hawaii: The impact of light on coffee quality. *En: 21st International Conference On Coffee Science, Association Scientifique Internationale Du Cafe, September 11th-15th, 2006, Montpellier, France.*
- Suárez Pascua, D. 2002. Cuantificación y valoración económica del servicio ambiental almacenamiento de carbono en sistemas agroforestales de café en la comarca Yassica Sur, Matagalpa, Nicaragua. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Suárez-Rozo, M. R. 2005. Above ground forest biomass and carbon status in the Río Grande de Arecibo watershed. Tesis M. S. Departamento Agronomía y Suelos, Universidad de Puerto Rico. 190 p.
- Suresh, C. K. y D. J. Bagyaraj. 2002. Mycorrhiza-microbe interactions: Effect on rhizosphere. *En: Sharma, A. K. y B. N. Johri. Arbuscular mycorrhizae: interactions in plants, rhizosphere and soils. Science Publishers New Hampshire, USA pp. 7-28.*
- Sylvain, P., 1955. Some observations on *Coffea arabica* L. in Ethiopia. *Turrialba* 5: 37-53.
- Thompson, M. V. y P. M. Vitousek. 1997. Asymbiotic nitrogen fixation and litter decomposition on a long soil-age gradient in Hawaiian montane rain forest. *Biotropica* 29: 134-144.
- Tilak, K. V. B. R. y C. S. Singh. 1988. Response of pearl millet (*Pennisetum americanum*) to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Azospirilla brasilense* with different sources of phosphorus. *Current Science* 57: 43-44.
- Tinker, P. B. 1997. The Environmental implications of intensified land use in developing Countries: *Philosophical Transactions. Biological Sciences* 352: 1023-1032.
- Todd, R. L., R. D. Meyer y J. B. Waide. 1978. Nitrogen fixation in a deciduous forest in the southeastern United States. *En: Granhall, U. (Ed.) Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. Ecological Bulletin (Stockholm)* 26: 172-177.

Turco, R. F. y M. J. Sadowsky (1995). Understanding the microflora of bioremediation. *En: Skipper, H. D. y R. F. Turco (Eds.). Bioremediation: Science and Applications. Soil Science (Special Publication) 43 (pp. 87-103). Madison, WI: Soil Science Society of America.*

Turnbull M. H., S. Schmidt, P. D. Erskine, S. Richards, G. R. Stewart, M. A. Topa, P. T. Rygiewicz, J. R. Cumming. 1996. Root adaptation and nitrogen source acquisition in natural ecosystems. *Tree Physiology 16: 941-948.*

Unkovich, M. y J. Baldock. 2008. Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian agriculture. *Soil Biology and Biochemistry 40: 2915-2921.*

Unkovich, M. J. y J. S. Pate. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research 65: 211-228.*

Uren, N. C. 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *En: Pinton, R., Z. Varanini y P. Nannipieri. The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, Inc. New York pp. 19-40.*

USDA (United States Department of Agriculture). 2009. Census of Agriculture 2007, Puerto Rico. USDA-NASS. Washington, DC. 235p.

Vaast, P. 2005. Sostenibilidad, calidad del café e impactos ambientales de los sistemas agroforestales con café de Centroamérica. *Boletín Promecafé No. 103.*

VanDunné, H. J. F. y J. H. D. Wolf. 2001. Development of epiphytic bryophyte and lichen vegetation on plantation coffee trees. *En: VanDunné, H. J. F. Epiphytes in secondary tropical rain forests. PhD thesis, Universiteit van Amsterdam. 123 pp.*

Van Kessel, C., R. E. Farrell, J. P. Roskoski y K. M. Keane. 1994. Recycling of the naturally-occurring ¹⁵N in an established stand of *Leucaena leucocephala*. *Soil Biology and Biochemistry 26: 757-762.*

Van Wambeke, A., H. Eswaran, A. J. Herbillon y J. Comerma. 1983. Oxisols. *En Wilding, L.P, Smeck, N.E., Hall, G.F. Pedogenesis and soil taxonomy. II The soil orders. Developments in Soil Science 11B. Elsevier. 410p.*

Vera- Núñez, J. A., O. A. Grageda-Cabrera y J. J. Peña-Cabriales. 2000. Metodologías para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Peña-Cabriales, J. J. (Ed.) Publicado por IMPROSA.*

Vicente-Chandler, J., F. Abruña, R. Bosque-Lugo y S. Silva. 1968. El cultivo intensivo de café en Puerto Rico. *Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico. Boletín 211.*

- Vitousek, P. M. 1999. Nutrient limitation to nitrogen fixation in young volcanic sites. *Ecosystems* 2: 505-510.
- Vitousek, P. M., K. Cassman, C. Cleveland, T. Crews, C. B. Field, N. B. Grimm, R. W. Howarth, R. Marino, L. Martinelli, E. B. Rastetter y J. I. Sprent. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1-45.
- Vitousek, P. M., y S. Hobbie. 2000. Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: Patterns and regulation. *Ecology* 81: 2366-2376.
- Vitousek, P. M., G. Shearer y D. H. Kohl. 1989. Foliar ^{15}N natural abundance in Hawaiian rain forest: patterns and possible mechanisms. *Oecologia* 78(3): 383-388.
- Waterer, J., J. Vessey, E. Stobbe, R. Soper. 1994. Yield and symbiotic nitrogen fixation in a pea mustard intercrop as influenced by nitrogen fertilizer addition. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 447-453.
- Weaver, P. L. 1988. *Guarea guidonia* (L.) Sleumer. American muskwood. SO-ITF-SM-17. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 7 p.
- Wood, T. E., D. Lawrence y D. A. Clark. 2005. Variation in leaf litter nutrients of a Costa Rican rain forest is related to precipitation. *Biogeochemistry* 73: 417-437.
- Yamaguchi, T. y D. J. C. Friend. 1979. Effect of leaf age and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica*. *Photosynthetica* 13: 271-278.
- Zuluaga P, J.J. 2004. Dinámica de la materia orgánica del suelo en sistemas agroforestales de café con *Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook en Costa Rica. Tesis M.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 116p.

9 APENDICES

Apéndice 1. Precipitación y temperatura mensual para el año 2008 en las localidades estudiadas

Mes	Jayuya		Lares		Las Marías	
	Precip. (mm)	Temp. (°C)	Precip. (mm)	Temp. (°C)	Precip. (mm)	Temp. (°C)
Enero	46.0	nd	46.2	19.2	113.3	19.5
Febrero	58.2	19.9	21.8	19.3	51.3	19.8
Marzo	122.7	19.4	52.1	19.4	70.6	19.3
Abril	177.8	20.1	243.6	20.4	186.4	20.4
Mayo	126.7	21.3	159.5	21.6	261.9	21.6
Junio	141.7	22.3	137.2	23.1	193.0	22.7
Julio	187.7	nd	136.7	22.8	224.3	22.7
Agosto	254.8	23.4	256.5	23.1	309.9	22.9
Septiembre	803.7	nd	594.9	23.0	686.1	21.6

Apéndice 2. Diámetro y altura de plantas de café en las zonas bajo estudio

Localidad	Sistema	Diámetro (cm)	Altura (m)	Densidad de plantas
Jayuya	Sol	6.1239	2.0183	4800
	Sombra	5.6019	2.2833	3050
Lares	Sol	7.6239	2.0300	2625
	Sombra	7.0708	2.0450	2317
Las Marías	Sol	6.2682	2.2567	3292
	Sombra	5.7842	2.5400	2900

Apéndice 3. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de bosque en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	RAIZ_microgramosN/g/	35	0.45	0.35	41.73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.17	5	0.03	4.66	0.0030
Mes	0.17	5	0.03	4.66	0.0030
Error	0.21	29	0.01		
Total	0.37	34			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.15051

Error: 0.0071 gl: 29

Mes	Medias	n	
Mayo	0.14	5	A
Junio	0.15	6	A
Abril	0.17	6	A
Julio	0.18	6	A
Agosto	0.23	6	A B
Septiembre	0.34	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Apéndice 4. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de café a sol en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.07	0.00	31.27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.9E-03	5	7.8E-04	0.45	0.8077
Mes	3.9E-03	5	7.8E-04	0.45	0.8077
Error	0.05	30	1.7E-03		
Total	0.06	35			

Apéndice 5. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de café con sombra en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.47	0.39	32.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.05	5	0.01	5.39	0.0012
Mes	0.05	5	0.01	5.39	0.0012
Error	0.06	30	1.9E-03		
Total	0.11	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07691

Error: 0.0019 gl: 30

Mes	Medias	n		
Agosto	0.09	6	A	
Mayo	0.09	6	A	
Julio	0.12	6	A	B
Septiembre	0.15	6	A	B
Junio	0.16	6	A	B
Abril	0.19	6		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Apéndice 6. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de bosque en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.18	0.05	38.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	5	4.1E-03	1.35	0.2706
Mes	0.02	5	4.1E-03	1.35	0.2706
Error	0.09	30	3.0E-03		
Total	0.11	35			

Apéndice 7. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de café a sol en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.05	0.00	54.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	5	1.5E-03	0.34	0.8874
Mes	0.01	5	1.5E-03	0.34	0.8874
Error	0.14	30	4.5E-03		
Total	0.14	35			

Apéndice 8. ANOVA y prueba de Tukey para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de café con sombra en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.44	0.35	37.69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.04	5	0.01	4.73	0.0026
Mes	0.04	5	0.01	4.73	0.0026
Error	0.05	30	1.7E-03		
Total	0.09	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07191

Error: 0.0017 gl: 30

Mes	Medias	n	
Julio	0.08	6	A
Abril	0.09	6	A
Mayo	0.10	6	A
Septiembre	0.10	6	A
Agosto	0.11	6	A
Junio	0.18	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Apéndice 9. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de bosque en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.24	0.11	43.32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.04	5	0.01	1.86	0.1312
Mes	0.04	5	0.01	1.86	0.1312
Error	0.13	30	4.4E-03		
Total	0.17	35			

Apéndice 10. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de café a sol en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.43	0.34	30.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.04	5	0.01	4.54	0.0034
Mes	0.04	5	0.01	4.54	0.0034
Error	0.05	30	1.8E-03		
Total	0.10	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07482

Error: 0.0018 gl: 30

Mes	Medias	n		
Agosto	0.10	6	A	
Abril	0.10	6	A	
Julio	0.12	6	A	B
Junio	0.16	6	A	B
Septiembre	0.17	6	A	B
Mayo	0.18	6		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)

Apéndice 11. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojarasca en sistema de café con sombra en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	RAIZ_microgramosN/g/	36	0.08	0.00	44.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	5	1.3E-03	0.50	0.7701
Mes	0.01	5	1.3E-03	0.50	0.7701
Error	0.08	30	2.6E-03		
Total	0.09	35			

Apéndice 12. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación N₂ promedio mensual en hojas en sistema de café a sol en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	microgramosN/g/mes	27	0.64	0.48	54.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.04	8	0.01	4.06	0.0065
Mes	0.04	8	0.01	4.06	0.0065
Error	0.02	18	1.3E-03		
Total	0.07	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.10392

Error: 0.0013 gl: 18

Mes	Medias	n		
Junio	0.02	3	A	
Marzo	0.02	3	A	
Septiembre	0.03	3	A	
Abril	0.06	3	A	B
Mayo	0.06	3	A	B
Agosto	0.07	3	A	B
Julio	0.08	3	A	B
Enero	0.11	3	A	B
Febrero	0.15	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0.05$)

Apéndice 13. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojas en sistema de café con sombra en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	microgramosN/g/mes	27	0.39	0.13	65.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	8	1.5E-03	1.47	0.2365
Mes	0.01	8	1.5E-03	1.47	0.2365
Error	0.02	18	1.0E-03		
Total	0.03	26			

Apéndice 14. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojas en sistema de café a sol en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	microgramosN/g/mes	24	0.33	0.04	60.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	7	1.1E-03	1.14	0.3849
Mes	0.01	7	1.1E-03	1.14	0.3849
Error	0.02	16	1.0E-03		
Total	0.02	23			

Apéndice 15. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojas en sistema de café con sombra en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	microgramosN/g/mes	24	0.42	0.17	48.66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	7	2.0E-03	1.67	0.1877
Mes	0.01	7	2.0E-03	1.67	0.1877
Error	0.02	16	1.2E-03		
Total	0.03	23			

Apéndice 16. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojas en sistema de café a sol en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	microgramosN/g/mes	27	0.22	0.00	69.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	8	2.0E-03	0.64	0.7354
Mes	0.02	8	2.0E-03	0.64	0.7354
Error	0.06	18	3.1E-03		
Total	0.07	26			

Apéndice 17. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en hojas en sistema de café con sombra en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	microgramosN/g/mes	27	0.33	0.04	45.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	8	1.7E-03	1.12	0.3932
Mes	0.01	8	1.7E-03	1.12	0.3932
Error	0.03	18	1.5E-03		
Total	0.04	26			

Apéndice 18. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de bosque en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	LOG2_microgramosN/g/	18	0.47	0.26	16746.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14.17	5	2.83	2.17	0.1263
Mes	14.17	5	2.83	2.17	0.1263
Error	15.68	12	1.31		
Total	29.85	17			

Apéndice 19. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de café a sol en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	LOG2_microgramosN/g/	17	0.41	0.14	132.30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20.76	5	4.15	1.52	0.2601
Mes	20.76	5	4.15	1.52	0.2601
Error	29.98	11	2.73		
Total	50.74	16			

Apéndice 20. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de café con sombra en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	LOG2_microgramosN/g/	18	0.54	0.35	106.34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20.60	5	4.12	2.80	0.0669
Mes	20.60	5	4.12	2.80	0.0669
Error	17.67	12	1.47		
Total	38.27	17			

Apéndice 21. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de bosque en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	LOG2_microgramosN/g/	18	0.32	0.03	185.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5.73	5	1.15	1.11	0.4042
Mes	5.73	5	1.15	1.11	0.4042
Error	12.38	12	1.03		
Total	18.11	17			

Apéndice 22. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de café a sol en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	LOG2_microgramosN/g/	17	0.51	0.28	108.23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11.41	5	2.28	2.26	0.1211
Mes	11.41	5	2.28	2.26	0.1211
Error	11.12	11	1.01		
Total	22.54	16			

Apéndice 23. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de café con sombra en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	LOG2_microgramosN/g/	18	0.50	0.29	182.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12.21	5	2.44	2.39	0.1007
Mes	12.21	5	2.44	2.39	0.1007
Error	12.28	12	1.02		
Total	24.49	17			

Apéndice 24. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de bosque en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	LOG2_microgramosN/g/	18	0.34	0.07	167.36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5.38	5	1.08	1.24	0.3509
Mes	5.38	5	1.08	1.24	0.3509
Error	10.43	12	0.87		
Total	15.80	17			

Apéndice 25. ANOVA para fijación de N₂ en líquenes en sistema de café a sol en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	LOG2_microgramosN/g/	18	0.29	3.4E-04	179.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10.03	5	2.01	1.00	0.4576
Mes	10.03	5	2.01	1.00	0.4576
Error	24.05	12	2.00		
Total	34.08	17			

Apéndice 26. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en líquenes en sistema de café con sombra en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	LOG2_microgramosN/g/	18	0.16	0.00	1239.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5.23	5	1.05	0.46	0.7955
Mes	5.23	5	1.05	0.46	0.7955
Error	27.02	12	2.25		
Total	32.24	17			

Apéndice 27. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de bosque en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.57	0.52	18.56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	36.45	5	7.29	12.65	<0.0001
Mes	36.45	5	7.29	12.65	<0.0001
Error	27.65	48	0.58		
Total	64.10	53			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.06359

Error: 0.5761 gl: 48

Mes	Medias	n				
Junio	2.66	9	A			
Mayo	3.54	9	A	B		
Julio	3.91	9		B	C	
Septiembre	4.64	9			C	D
Agosto	4.66	9			C	D
Abril	5.11	9				D

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Apéndice 28. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de plantas de café a sol en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.11	0.01	17.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.85	5	0.37	1.14	0.3546
Mes	1.85	5	0.37	1.14	0.3546
Error	15.66	48	0.33		
Total	17.52	53			

Apéndice 29. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de plantas de café con sombra en Jayuya

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.14	0.06	37.38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22.29	5	4.46	1.62	0.1730
Mes	22.29	5	4.46	1.62	0.1730
Error	132.15	48	2.75		
Total	154.44	53			

Apéndice 30. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de bosque en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.13	0.04	26.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6.67	5	1.33	1.47	0.2158
Mes	6.67	5	1.33	1.47	0.2158
Error	43.42	48	0.90		
Total	50.08	53			

Apéndice 31. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de plantas de café a sol en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.18	0.10	23.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8.18	5	1.64	2.12	0.0791
Mes	8.18	5	1.64	2.12	0.0791
Error	37.08	48	0.77		
Total	45.26	53			

Apéndice 32. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de plantas de café con sombra en Lares

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.28	0.20	24.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13.33	5	2.67	3.68	0.0067
Mes	13.33	5	2.67	3.68	0.0067
Error	34.75	48	0.72		
Total	48.08	53			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.19235

Error: 0.7240 gl: 48

Mes	Medias	n		
Abril	2.74	9	A	
Agosto	3.11	9	A	B
Septiembre	3.41	9	A	B
Mayo	3.81	9	A	B
Junio	3.88	9	A	B
Julio	4.21	9		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Apéndice 33. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de bosque en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BQ	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.17	0.08	35.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20.38	5	4.08	1.98	0.0984
Mes	20.38	5	4.08	1.98	0.0984
Error	98.76	48	2.06		
Total	119.14	53			

Apéndice 34. ANOVA para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de plantas de café a sol en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SL	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.10	0.01	18.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.69	5	0.54	1.12	0.3611
Mes	2.69	5	0.54	1.12	0.3611
Error	22.99	48	0.48		
Total	25.68	53			

Apéndice 35. ANOVA y prueba de Tukey (5%) para fijación de N₂ promedio mensual en suelo de plantas de café con sombra en Las Marías

Sistema	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	RAIZ_gN/ha/mes	54	0.26	0.18	51.26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	89.67	5	17.93	3.29	0.0123
Mes	89.67	5	17.93	3.29	0.0123
Error	261.46	48	5.45		
Total	351.13	53			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3.27058

Error: 5.4471 gl: 48

Mes	Medias	n		
Mayo	3.60	9	A	
Agosto	3.64	9	A	
Septiembre	3.66	9	A	
Abril	4.48	9	A	B
Julio	4.66	9	A	B
Junio	7.28	9		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)