

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**VARIABILIDAD DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE
NITRÓGENO DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN
URUGUAY: POSIBLES CAUSAS Y CONSECUENCIAS
NUTRICIONALES**

por

Facundo LUSSICH RACHETTI

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
SEPTIEMBRE 2020

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: Dr. Jorge Monza, Ing. Agr. (PhD) Carlos Perdomo, y Ing. Agr. (PhD) Priscila Pinto el 03 de septiembre de 2020.
Autor/a: Ing. Agr. Facundo Lussich. Director/a: Ing. Agr. (PhD) Fernando A. Lattanzi.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer enormemente a mi director de tesis Fernando Lattanzi que me enseñó, me formó y me guió durante todo el proceso de la maestría. A Gerónimo Cardozo que también formó parte de este proceso y del grupo de discusión en fijación biológica de nitrógeno.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por facilitar materiales, recursos e instalaciones para la realización de la tesis. A los laboratorios de Suelos, Plantas y Agua, y de Nutrición Animal del INIA donde hice parte del procesamiento de muestras.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico para la beca.

Al Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur (Procisur) por el apoyo económico al proyecto.

A todo el grupo de Pasturas y Forrajes del INIA por sus aportes y apoyo.

Finalmente a mi familia y amigos por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, y siempre!

MUCHAS GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN PASTURAS SEMBRADAS 1	
1.1.1. Aspectos generales de la fijación biológica de nitrógeno.....	1
1.1.2. Estimaciones globales de la FBN y variabilidad	1
1.1.3. La FBN en sistemas pastoriles intensivos: impacto en la sustentabilidad	2
1.1.4. Pasturas con inclusión de leguminosas	3
1.1.5. Cuantificación del N procedente de la FBN por el método de abundancia de ¹⁵ N	4
1.2 CONTRIBUCIÓN DE LAS LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN LA FBN EN URUGUAY	6
1.2.1 Pasturas sembradas en Uruguay	6
1.2.2 Aporte de N a los sistemas por las leguminosas forrajeras	7
1.2.3 Estimación de la FBN por leguminosa forrajera a nivel nacional.....	8
1.3. FACTORES QUE AFECTAN LA FBN	9
1.3.1. Factores bióticos.....	9
1.3.2 Factores abióticos	11
1.4. ÍNDICE DE NUTRICIÓN NITROGENADA COMO INDICADOR DE ESTADO NUTRICIONAL DE LAS PLANTAS	16
1.4.1 Índice de nutrición nitrogenada para C3.....	16
1.4.2 Índice de nutrición nitrogenada para C4.....	18
1.5 OBJETIVOS	19
1.5.1 Objetivo general.....	19
1.5.2 Objetivos específicos	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 RELEVAMIENTO: SITIOS, PERÍODO Y MUESTREO.....	20
2.2 ESTIMACIÓN DEL N DERIVADO DE LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA POR MÉTODO DE LA ABUNDANCIA NATURAL DE ¹⁵ N	23
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
3. RESULTADOS	26
3.1 VARIABILIDAD DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA	26

3.1.1 Porcentaje de nitrógeno derivado del aire	26
3.1.2 Kilogramos de N por tonelada de materia seca.....	27
3.1.3 Relación entre kg N fijado/t MS y %Ndfa	28
3.2 POSIBLES CAUSAS DE LA VARIABILIDAD EN FBN.....	29
3.3 CONSECUENCIAS DE LA VIARIABILIDAD DE LA FBN SOBRE NUTRICIÓN NITRÓGENADA DE LA PLANTA	43
4. DISCUSIÓN.....	47
4.1 VALORES GLOBALES DE %Ndfa y kg N fijados/t MS	47
4.2 POSIBLES CAUSAS DE VARIACIÓN DE %Ndfa	50
5. CONCLUSIONES.....	59
6. BIBLIOGRAFÍA.....	60
7. ANEXOS.....	74
7.1 FIGURAS Y CUADROS	74
7.2 BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION VARIABILITY IN FORAGE LEGUMES OF URUGUAY: POSIBLES CUASES.....	85

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) de las leguminosas forrajeras es una de las principales entradas de nitrógeno (N) en los sistemas pastoriles de Uruguay. Los objetivos de este trabajo fueron: a) Cuantificar la variabilidad existente en la proporción del nitrógeno total fijado atmosféricamente (%Ndfa) y en la eficiencia de fijación (kg N fijado/t MS) en especies de leguminosas forrajeras usadas en Uruguay: *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, y *Trifolium pratense*; b) determinar si la variabilidad observada en %Ndfa está asociada a (i) parámetros químicos del suelo; (ii) parámetros de planta; (iii) factores de manejo; y (iv) ecorregiones; y c) analizar si la variabilidad observada en (a) está asociada al índice de nutrición nitrogenada (INN) de las especies. Entre octubre y noviembre de 2018, se muestrearon 206 pasturas comerciales en todo el país. En cada marco, el material vegetal cosechado se separó por especie y se cuantificó: biomasa verde, concentración de C, N y P, y la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. El %Ndfa se estimó por el método de la abundancia natural de ^{15}N . Asociado a cada marco se obtuvo una muestra de suelo (0-15 cm) en la que se determinaron 12 parámetros químicos. El %Ndfa varió substancialmente para trébol blanco (mediana 78%, rango 25-100%), para lotus (mediana 79%, rango 30-100%), para alfalfa (mediana 63%, rango 28-89%), y tuvo menor variación para trébol rojo (mediana 84%, rango 60-100%). En alfalfa, lotus, trébol blanco y rojo se observaron valores promedios de 22, 27, 26 y 28 de kg N fijado/t MS respectivamente; y coeficientes de variación de 36, 30, 28 y 24 % en ese mismo orden. Cinco factores (pH, PMN, %leguminosa, %N y la relación N/P en planta) lograron explicar como máximo el 44% de la variabilidad en %Ndfa. Este trabajo demostró que (a) existe amplia variabilidad en el %Ndfa, especialmente en lotus y trébol blanco, y menos variabilidad en kg N fijado/t MS; y (b) que la disponibilidad de N mineral para la leguminosa y la demanda de N de la planta explicaron la mayor parte de la variabilidad encontrada en %Ndfa; y (c) la variación en el %Ndfa o en kg N fijado/t MS no estuvo asociado al INN de las especies.

Palabras claves: Fijación biológica de nitrógeno, *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION VARIABILITY IN FORAGE LEGUMES OF URUGUAY: POSSIBLE CAUSES AND NUTRITIONAL CONSEQUENCES

SUMMARY

Biological nitrogen fixation (BNF) is one of the main sources of nitrogen (N) in pasture-based production systems in Uruguay. The objectives of this work were: a) To quantify the existing variability in the proportion of N derived from air (%Ndfa) and in the fixation efficiency (kg N fixed /t DM) of legume for the four main forage legume species used in Uruguay: *Medicago sativa* , *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, and *Trifolium pratense*; b) determine whether the variability observed in %Ndfa is associated with (i) soil fertility; (ii) plant nutritional status; (iii) pasture management; and (iv) ecoregions; and c) analyze if the variability observed in (a) is associated with the Nitrogen Nutrition Index (NNI) of the species. Between October and November 2018, 206 pastures were sampled throughout the country. In each frame, the harvested plant material was separated by species, and green biomass, plant C, N and P concentration, and plant ratio $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ were quantified. The % Ndfa was estimated by ^{15}N natural abundance method. Associated with each pasture sampling, a soil sample (0-15 cm) was obtained in which 12 soil chemical parameters were determined. The %Ndfa varied substantially in white clover (median 78%, range 25-100%), in lotus (median 79%, range 30-100%), in alfalfa (median 63%, range 28-89%), and less so in red clover (median 84%, range 60-100%). In alfalfa, lotus, white and red clover average values of 22, 27, 26 and 28 kg N fixed/t DM respectively were observed; and variation coefficients of 36, 30, 28 and 24 % in that same order. Five factors (pH, NMP, %legume, %N and plant N/P ratio) accounted for a maximum of 44% of %Ndfa variation. This work showed that (a) there is a wide variability in %Ndfa, especially in lotus and white clover, and less variability in kg N fixed / t DM; and (b) soil mineral N availability for the legume and plant N demand explained most of %Ndfa variability; and (c) %Ndfa or kg N fixed/ t DM variability was not associated with the NNI of the species.

Key words: Biological nitrogen fixation, *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN PASTURAS SEMBRADAS

1.1.1. Aspectos generales de la fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno (N) es el elemento más abundante en la atmósfera, representando el 79% del volumen total. Este se encuentra en forma de dinitrógeno (N_2), estado en el cual no está disponible para el crecimiento vegetal (Unkovich *et al.*, 2008). Asimismo, el N es uno de los elementos más limitantes en los ecosistemas terrestres para el desarrollo de las plantas. Un grupo minoritario de procariotas conocidos como diazotrofos, en vida libre o en simbiosis, son capaces de reducir el N_2 a NH_4^+ , forma que puede ser utilizada por las plantas. Este proceso es conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Se estima que 122 Tg de N son fijadas anualmente por los ecosistemas terrestres, de los cuales 50-70 Tg de N corresponden a fijación en sistemas agrícolas (Herridge *et al.*, 2008). Lindström *et al.* (2010) sostienen que dentro de los sistemas agrícolas las leguminosas forrajeras son responsables de fijar entre 12 y 25 Tg de N anualmente. Por otro lado, la síntesis de fertilizante nitrogenado mediante el proceso Haber-Bosch se estima en 100 Tg de N anuales. Por lo tanto, la FBN es todavía la mayor fuente de entrada de N a los agroecosistemas.

1.1.2. Estimaciones globales de la FBN y variabilidad

La FBN es altamente variable dependiendo de la especie de leguminosa y de las condiciones ambientales. La proporción del N total en planta que proviene de fijación biológica (%Ndfa) es altamente variable, pudiendo oscilar entre 5 y 97% (Unkovich y Pate, 2000). En este mismo sentido, Büchi *et al.* (2015) reportan gran variabilidad en el %Ndfa entre e intra especies para 19 leguminosas evaluadas, con valores que oscilaron desde 0% hasta casi 100%. Collino *et al.* (2015) determinaron

el %Ndfa en cultivos de soja sembrados en diferentes zonas de Argentina y reportaron valores promedio de 58%, aunque variaron desde 12% a 90%. Esta variabilidad se debe a que la magnitud de la FBN está regulada por distintos parámetros, entre los cuales se destacan como principales: la especie de leguminosa, la fertilidad del suelo, el manejo de la fertilización, el tipo de labranza del suelo y las condiciones climáticas (Jensen 1996, Carranca *et al.* 1999, van Kessel y Hartley 2000).

Por otra parte, la cantidad de N que aportan las leguminosas al sistema está determinado por %Ndfa y por la producción de materia seca de la leguminosa, siendo esta última la principal determinante del N que entra al sistema por FBN (Unkovich, 2012). Los diferentes trabajos reportan tasas de fijación de N₂ en tejidos aéreos de hasta 373 kg N/ ha / año para trébol rojo (*Trifolium pratense*), 545 kg N/ ha/ año para trébol blanco (*Trifolium repens*), 350 kg N/ ha/ año para alfalfa (*Medicago sativa*) y 138 kg N/ ha/ año para lotus (*Lotus corniculatus*) (Carlsson y Huss-Danell 2003, Gregerson *et al.*, 1999).

1.1.3. La FBN en sistemas pastoriles intensivos: impacto en la sustentabilidad

Por un lado, sistemas con un mismo *input* de N, productividad de la pastura e intensidad de pastoreo presentan una huella de N similar, por lo que no necesariamente hay ventajas ambientales al sustituir el N proveniente del fertilizante por N fijado. En otras palabras, en sistemas pastoriles donde se utilicen fertilizante o fijación biológica, y tengan similar productividad, carga o producción animal, los costos y beneficios ambientales posiblemente sean los mismos (Unkovich 2012). Este autor sostiene que se debe a que la huella de N en los sistemas lecheros está relacionada principalmente al N excretado por los animales, y no al *input* de N en sí mismo. Si bien sustituir N de fertilizante por N proveniente de fijación biológica mejora el balance de N teórico del predio, esa mejora es pequeña si se compara con un manejo ajustado de la fertilización en el sistema.

En un estudio realizado por Ledgard *et al.* (1999) se demostró que cambiar de un sistema de producción que tenga un *input* de 200 kg N/ ha/ año de fertilizante a un

sistema con inclusión de leguminosas y sin fertilización nitrogenada, permite reducir las pérdidas por lavado un 50%, pero disminuye la producción de leche en un 20%.

Si bien en el pasado se pensaba que la FBN en leguminosas contribuía directamente a disminuir las emisiones N_2O , recientemente se demostró que no necesariamente es así (Rochette y Janzen 2005), y que el impacto de la FBN en la huella de N es mínimo.

Por otro lado, si se considera la energía necesaria para fabricar fertilizante en forma de urea (0,73 - 2,14 kg de CO_2 / kg de urea, Ledgard *et al.*, 2011), entonces la FBN sí tendría un efecto potencial sobre la emisión de gases con efecto invernadero (Ledgard *et al.*, 2009). Esto es a nivel de predio, ya que del total de CO_2 producido en el proceso de fabricación de fertilizante representa el 1% del CO_2 emitido a nivel global (Unkovich, 2012).

En este mismo sentido Jensen *et al.* (2012) sostienen que la utilización de leguminosas como fuente de N reduce las emisiones de CO_2 vinculadas a la energía fósil necesaria para producir fertilizantes nitrogenados. Asimismo, hay una reducción de los costos de los sistemas productivos cuando se sustituye el N del fertilizante por N proveniente de la FBN. Además, las leguminosas se adaptarían mejor a condiciones de elevadas concentraciones de CO_2 atmosférico y al cambio climático (Lüscher *et al.*, 2014).

1.1.4. Pasturas con inclusión de leguminosas

Los principales beneficios de incluir leguminosas en las pasturas son: i) la transferencia de N a las especies acompañantes, ii) mejora de la fertilidad del suelo, iii) aumento de la producción animal por un aumento en la digestibilidad y proteína de la pastura, y iv) una reducción en los costos de producción (Simioni *et al.*, 2014).

Las leguminosas cuando crecen junto a gramíneas son capaces de utilizar el N_2 como principal fuente de N, con valores promedio a campo de 80% (Carlsson y Huss-Danell, 2003). Nesheim y Boller (1991) demostraron que la competencia con la gramínea por el NO_3^- disponible en suelo tendió a reducir el crecimiento y la acumulación de N en trébol blanco, y a aumentar el %Ndfa. En este mismo sentido,

Xiao *et al.* (2004) observaron que el consumo de N por una especie no leguminosa intersemebrada con una leguminosa afectó los niveles de N mineral disponibles a tal punto que la FBN fue mayor que para una leguminosa sembrada pura.

En general, la transferencia directa de N por parte de la leguminosa a la especie acompañante suele ser baja, menor al 10% del total de N fijado (Morris *et al.*, 1990). En su revisión Peoples *et al.* (2015) sostienen que varios trabajos reportan que entre un 0 y un 15% del N en las especies no leguminosa corresponde a N transferido de la FBN.

Por otro lado, en un estudio realizado por Mallarino *et al.* (1990b) reportaron que la transferencia de N desde la leguminosa a la gramínea representó el 20% del N total de esta última en el primer año de la pastura, y el segundo año aumentó a un 60%. A su vez, sostienen que a medida que aumentó el porcentaje de leguminosa en la muestra aumentó la proporción de N transferido.

El efecto positivo de la mezcla de gramíneas y leguminosas sobre la biomasa no se debe únicamente al aporte de N fijado por esta última, sino que existe un efecto estimulante en la absorción de N por parte de las dos especies en competencia, y un aumento en la eficiencia de utilización del N (Nyfeler *et al.*, 2011).

La inclusión de leguminosas seleccionadas por su comportamiento frente a déficit hídrico en mezclas con gramíneas puede mejorar la resistencia y resiliencia del tapiz vegetal frente a eventos de sequía (Hofer *et al.*, 2017). Estos autores concluyen que las leguminosas tienen mayor tolerancia al déficit hídrico, ya que son capaces de compensar la limitante de N mineral con el N proveniente de fijación biológica.

1.1.5. Cuantificación del N procedente de la FBN por el método de abundancia de ^{15}N

El N_2 se encuentra en dos formas isotópicas, ^{14}N y ^{15}N . La vasta mayoría del N atmosférico es ^{14}N (96,63%), mientras que el restante 0,36% es ^{15}N (Mariotti, 1983). El N mineral tiende a estar enriquecido en ^{15}N debido a la discriminación isotópica, ya que el isótopo ^{15}N es más pesado que el ^{14}N , y sus formas minerales sufren los procesos de desnitrificación y volatilización de forma más lenta. Este

enriquecimiento natural del suelo en ^{15}N puede ser utilizado para estimar la FBN. Las diferencias en el contenido de ^{15}N entre leguminosas y especies de referencia no fijadoras creciendo en un mismo suelo pueden utilizarse para calcular el %Ndfa.

Cuando una leguminosa nodulada crece en un ambiente con escaso N mineral disponible en suelo, entonces es dependiente del N_2 para su crecimiento, por lo que su composición isotópica es semejante a la de la atmósfera ($\delta^{15}\text{N}$ 0‰). A su vez, si una leguminosa crece en un ambiente con abundancia de disponibilidad de N mineral, entonces su principal fuente de N es el suelo y su $\delta^{15}\text{N}$ será semejante a la de él (ej.: $\delta^{15}\text{N}$ 5‰). Así, una leguminosa que utiliza N del suelo y N atmosférico para cubrir su demanda, tiene un $\delta^{15}\text{N}$ con un valor intermedio entre el de la atmósfera y del suelo (ej.: $\delta^{15}\text{N}$ 3‰). Estas diferencias permiten estimar que proporción del N total de la planta que proviene del suelo y de la atmósfera (Unkovich *et al.*, 2008).

La fracción de N derivada de la fijación simbiótica (% Ndfa) se puede estimar de la siguiente forma:

$$\% \text{Ndfa} = [(\delta^{15}\text{N referencia} - \delta^{15}\text{N leguminosa}) / (\delta^{15}\text{N referencia} - \text{B})] \times 100$$

Donde $\delta^{15}\text{N}$ es el enriquecimiento en ^{15}N expresado en ‰ en relación con el N atmosférico (0,3663‰); $\delta^{15}\text{N referencia}$ es el $\delta^{15}\text{N}$ de la planta no fijadora, teniendo al N del suelo como única fuente nitrogenada; $\delta^{15}\text{N leguminosa}$ es el $\delta^{15}\text{N}$ de la especie leguminosa; B es el $\delta^{15}\text{N}$ de la leguminosa teniendo al N_2 como única fuente de N.

Los métodos que utilizan al isotopo estable ^{15}N son considerados los más confiables y además proporcionan información sobre el N incorporado en un período de tiempo (Unkovich, 2012). Actualmente, la abundancia del ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) es la técnica más adecuada para medir la FBN a nivel de campo en leguminosas templadas. Sin embargo, este método tiene algunas limitaciones que se deben tener en cuenta cuando se aplica para poder analizar correctamente sus estimaciones. Shearer y Kohl (1986) destacan las principales limitaciones del método de la abundancia de ^{15}N . En primer lugar, tanto el $\delta^{15}\text{N}$ de la parte aérea de la leguminosa creciendo sin N mineral

y de la planta de referencia no fijadora, no representan exactamente el $\delta^{15}\text{N}$ de la atmósfera y del suelo respectivamente, ya que existe fraccionamiento isotópico dentro de la planta. En segundo lugar, estimar el $\delta^{15}\text{N}$ del suelo mediante la planta de referencia puede inducir a errores, ya que varía con la profundidad y estación del año. Además, las leguminosas y las plantas no fijadoras no siempre tienen igual tasa de absorción de nutrientes, tipo de sistema radicular y estación de crecimiento, por lo que el *pool* del N al que acceden es diferente. En tercer lugar, cuando la diferencia entre el $\delta^{15}\text{N}$ de la planta fijadora y no fijadora es menor a 2‰ el error en la estimación del %Ndfa es considerable.

1.2 CONTRIBUCIÓN DE LAS LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN LA FBN EN URUGUAY

1.2.1 Pasturas sembradas en Uruguay

El Uruguay tiene un total de 16.357.000 ha productivas de las cuales 13.752.133 aproximadamente son destinadas al pastoreo (DIEA, 2017). De la superficie de pastoreo 2.450.279 ha corresponden a superficie mejoradas que incluyen campo natural mejorado y fertilizado, pasturas artificiales y cultivos forrajeros anuales. A su vez, de esta área 1.141.427 ha son pasturas artificiales que corresponden al 8,3% de la superficie total de pastoreo.

En las condiciones climáticas del Uruguay prosperan tanto especies de clima templado como de clima subtropical (Carámbula, 2002). Las especies gramíneas perennes más utilizadas en pasturas cultivadas son la festuca (*Festuca arundinacea*), el dactilis (*Dactylis glomerata*), el bromus (*Bromus catharticus*), el holcus (*Holcus lanatus*) y el raigrás (*Lolium spp.*); las cuales presentan un amplio rango de adaptación a los diferentes manejos y suelos en el país. Por otra parte algunas de las principales leguminosas perennes incluyen la alfalfa (*Medicago sativa*), el lotus (*Lotus spp.*), el trébol blanco (*Trifolium repens*), y el trébol rojo (*Trifolium pratense*).

Algunas de las principales especies que se utilizan en verdeos anuales incluyen: avena (*Avena bizantina*, *A. sativa*, y *A. strigosa*) y raigrás (*Lolium multiflorum*) como

especies invernales; y sudangrás (*Sorghum sudanense*) y moha (*Setaria italica*) como especies estivales.

Las pasturas mixtas con especies de ciclo complementario al campo natural son vastamente utilizadas con el fin de obtener altas producciones de materia seca, mitigar la estacionalidad de la oferta de forraje, y a su vez contar con alimento de alto valor nutritivo. En estas pasturas con especies perennes de gramíneas invernales y leguminosas de ciclo invernal y estival, la menor producción de forraje se obtiene en verano y la mayor producción se produce en primavera, época en que la mayoría de las especies se encuentran en la etapa reproductiva (Carámbula, 2002).

1.2.2 Aporte de N a los sistemas por las leguminosas forrajeras

Las leguminosas cumplen un rol fundamental en las pasturas ya que producen forraje de alta calidad durante todo el año y fijan N de la atmósfera recuperando la fertilidad de los suelos. Las leguminosas forrajeras más utilizadas en las pasturas sembradas del Uruguay son el trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), lotus (*Lotus corniculatus*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

En general, para estas leguminosas la variabilidad temporal en las tasas de crecimiento muestra importantes diferencias estacionales con una tendencia de variación similar para las cuatro leguminosas (Díaz *et al.*, 1996). Estos autores reportaron que en los meses de otoño-invierno donde se registran las temperaturas más bajas se encontraron pocas diferencias entre especies, y las tasas variaron entre 10 y 15 kg MS/ ha/ día. Mientras que a finales de invierno y en primavera el crecimiento aumentó considerablemente produciéndose diferencias entre especies, con tasas que oscilaron entre 40 y 85 kg MS/ ha/ día, siendo la alfalfa la que alcanzó los valores máximos. A su vez, sostienen que la alfalfa y trébol rojo (hasta su segundo año) son las especies más estables en cuanto a la producción de forraje en las condiciones evaluadas, seguidas por lotus y posteriormente trébol blanco.

Por otro lado, Mallarino *et al.* (1990a) evaluaron el aporte de N al sistema en dos experimentos por dos años por parte de 3 leguminosas (trébol blanco, trébol rojo y lotus) en pasturas con festuca. La especie que aportó mayor cantidad de N al sistema

durante los dos años fue el trébol rojo con 390 kg/ ha y 330 kg/ ha, seguido por trébol blanco (257 kg/ ha y 242 kg/ ha) y lotus (187 kg/ ha y 293 kg/ ha).

1.2.3 Estimación de la FBN por leguminosa forrajera a nivel nacional

García *et al.* (1994) reportan valores de %Ndfa para trébol blanco, trébol rojo, alfalfa y lotus cercanos al 90% en invierno y primavera, y eficiencias expresadas como kg de N fijado por tonelada de materia seca de 31, 35, 32 y 27 respectivamente. Estos estudios fueron realizados a nivel parcelarios para pasturas de 2 años con 5 años de estimaciones de parámetros simbióticos para lotus y trébol blanco y 1 año para alfalfa y trébol rojo. Estas estimaciones fueron realizadas con técnicas de dilución isotópicas.

En experimentos donde se evaluaban mezclas de trébol blanco, trébol rojo o lotus con festuca se reportan valores promedio de 18 y 34 kg N/ ha/ año transferidos desde la leguminosa a la gramínea acompañante en praderas de primer y segundo año respectivamente (Mallarino *et al.*, 1990b).

En un experimento de dos años en el que se evaluó la FBN Mallarino *et al.* (1990a) en pasturas binarias de trébol blanco, trébol rojo o lotus con festuca reportan que los mayores %Ndfa se obtuvieron en invierno y primavera, alcanzando valores promedio de 82 y 95% respectivamente sin diferencias significativas entre especies. Los mayores valores de N fijado por hectárea fueron para la mezcla trébol rojo-festuca para ambos años (390 y 330 kg N/ ha/ año), explicados principalmente por un mayor producción de materia seca de la leguminosa. A su vez, estos autores reportaron relaciones lineales y negativas entre la proporción de cualquiera de estas leguminosas en la mezcla y el %Ndfa.

La fertilización con 100 kg de N/ ha redujo el %Ndfa de 18 a 20 semanas post aplicación y fue más evidente en aquellas parcelas con mayor proporción de leguminosas (Mallarino y Wedin, 1990). También reportaron una reducción en los kg de N fijado por hectárea para todas las especies de leguminosas cuando se aplica fertilizantes nitrogenados por una disminución en la proporción de leguminosas en la parcela. Las pasturas en el año de implantación fueron las más sensibles a aplicación

con N, y la mezcla que contenía lotus mostró la mayor sensibilidad dentro de las especies leguminosas.

1.3. FACTORES QUE AFECTAN LA FBN

La FBN es afectada principalmente por la producción y persistencia de la leguminosa, por las especies no-leguminosas acompañantes en la mezcla y por la disponibilidad de N mineral (Ledgard y Steele, 1992). Estos factores son influenciados por variables de suelo, ambientales y de manejo, que se pueden agrupar como factores bióticos y abióticos.

1.3.1. Factores bióticos

1.3.1.1 Microorganismos del suelo

En general la inoculación de leguminosas permite asegurar la correcta nodulación y establecimiento de las mismas. Tal es el caso reportado por Ali *et al.* (2010) en el cual reportaron que la inoculación de diferentes leguminosas en suelos franco-arcillosos tuvo un efecto positivo sobre su producción y nodulación.

Los inoculantes comerciales utilizados en trébol blanco, trébol rojo, lotus y alfalfa en Uruguay fueron seleccionados hace décadas para condiciones de manejo y de suelo muy diferente a las actuales. La competencia entre las cepas de los inoculantes y las cepas nativas del suelo es un problema vastamente conocido (diCenzo *et al.*, 2018). El N fijado en una pastura inoculada se asume que proviene del nódulo con la cepa del inoculante, pero la realidad es que la cepa que ocupa el nódulo no se conoce con certeza (Altier *et al.*, 2013). En este mismo sentido, Batista *et al.* (2015) evaluaron la inoculación de trébol rojo en diferentes tipos de suelos en Uruguay, y confirmaron que la cepa utilizada como inoculante para esta especie puede ser poco competitiva en suelos que tengan cepas de rizobio nativas-naturalizadas. También en trébol blanco la competitividad de la cepa usada como inoculante es baja, y los nódulos son ocupados minoritariamente por ella (Gutiérrez *et al.* 2019).

Según lo reportado por Irisarri *et al.* (2019) la utilización de cepas de rizobio nativas-naturalizadas que fueron seleccionadas por eficiencia de fijación de N en trébol blanco resultaron en mayores cantidades de N fijado por unidad de materia seca, y en similar o mayor ocupación de nódulo, establecimiento de plantas, y producción de materia seca respecto al inoculante comercial.

1.3.1.2 Plagas y enfermedades

Tanto las enfermedades foliares como las radicales y las plagas que afectan a las leguminosas tienen un efecto negativo sobre el vigor y producción potencial de las mismas, afectando la fijación de N. Johnstone y Barbetti (1987) reportan pérdidas productivas de 10 a 90% para leguminosas debido a enfermedades en Australia. Así mismo, Riffkin *et al.* (1999) realizaron un estudio en predios productivos del suroeste de Victoria en Australia donde encontraron que según la textura del suelo los nemátodos fueron un factor que logró explicar parte de la variación encontrada en la proporción de N que proviene del aire y/o los kg de N fijado por unidad de materia seca.

La utilización de variedades mejoradas específicamente por la resistencia a enfermedades, permite minimizar las pérdidas ocasionadas por estas (Altier, 2010). Estrategias basadas en microbios para mejorar el establecimiento y la fijación de N son actualmente utilizadas a nivel global a través de la aplicación de tecnología rizobial (Catroux *et al.*, 2001). En esta misma línea, Altier *et al.* (2013) sostienen que la explotación de PGRP (rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas) inoculado junto a rizobios constituye una alternativa interesante para mejorar la fijación de N y reducir las enfermedades en leguminosas forrajeras. La utilización de diferentes cepas de *P. fluorescens* en semillas de alfalfa han demostrado ser efectivas en la inhibición de enfermedades de semilla (Quagliotto *et al.*, 2009). Estos autores demostraron que la inoculación con esa bacteria produjo un aumento del 10 al 13% en el número de plantas en comparación con el control. A su vez, el uso de bacterias para biocontrol aumentó la biomasa aérea entre 15 y 18% para alfalfa.

1.3.2 Factores abióticos

1.3.2.1 Estrés hídrico

El anegamiento en suelo reduce la nodulación, la producción de materia seca y el N total acumulado en la parte aérea de la planta (Alves *et al.*, 2012). Estos autores encontraron varias cepas adaptadas a condiciones de anegamiento que lograron mejores eficiencias de fijación de N que el control con adicción de fertilizante nitrogenado.

En general, existen diferencias en la tolerancia de las leguminosas forrajeras al anegamiento. Las leguminosas tolerantes son capaces de formar nódulos, y tener difusión interna de oxígeno que les permite mantener el metabolismo de las raíces y la fijación de N en los nódulos sumergidos. Se reportan reducciones en la tasa de crecimiento del 50% para *Medicago sativa* y *Trifolium pratense*, y del 25% para *Lotus corniculatus* y *Lotus tenuis* que presentan mayor tolerancia al anegamiento (Striker y Colmer, 2017).

Por otro lado, en condiciones de baja disponibilidad de agua disminuye la FBN ya que se resiente la actividad de la nitrogenasa. La misma se reduce por una menor demanda de N por parte de la planta, que reduce su crecimiento, y por una menor cantidad de fotosintatos que llegan al nódulo (Unkovich, 2012). En un estudio realizado por Hofer *et al.*, 2017 encontraron que en condiciones de déficit hídrico el trébol blanco presentó reducciones severas en la proporción de N que proviene de la atmósfera, alcanzando valores de 56%.

1.3.2.2 Temperatura

La temperatura es otro factor que afecta marcadamente la sobrevivencia y persistencia de las distintas cepas de rizobio en suelo, pero su influencia depende del tipo de cepa y suelo (Sadowsky, 2005).

Las altas temperaturas en suelos afectan el proceso de infección de la planta por parte del rizobio necesario para la formación de nódulos (Sadowsky, 2005). A su vez, las temperaturas elevadas aceleran la senescencia de los nódulos afectando su

persistencia. Este mismo autor, sostiene que las diferentes combinaciones de leguminosa-rizobio tienen una temperatura óptima de funcionamiento, siendo para los tréboles 30°C.

A 4°C, si bien existe sobrevivencia de rizobios el crecimiento es escaso a esta temperatura (Trinick, 1982). Además, las bajas temperaturas en el suelo pueden afectar a la FBN, aunque en menor medida que la absorción de nitratos (Hatch y Macduff 1991). Dart y Day (1971) reportaron que la gran mayoría de las leguminosas utilizadas en el estudio, incluyendo trébol rojo y alfalfa, continuaron fijando N a 2°C. A su vez, Nesheim y Boller (1991) reportan que, a temperaturas de 7,5°C el %Ndfa y la cantidad de N fijado por planta es menor en comparación con temperaturas de 15°C para trébol blanco. Las bajas temperaturas acentúan la competencia por nitratos y la capacidad de competencia del trébol blanco se ve limitada por menor crecimiento y acumulación de N.

1.3.2.3 Propiedades químicas del suelo

El ambiente del suelo influye enormemente sobre el crecimiento, sobrevivencia y actividad metabólica de los microorganismos y de las plantas, afectando su capacidad de establecer interacciones simbióticas. Una de las principales propiedades químicas del suelo que afecta la FBN es el grado de acidez de los suelos. Los suelos ácidos afectan la densidad de rizobios ya que tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y sobrevivencia de los mismos (Brockwell *et al.*, 1991). Relativamente pocos rizobios son capaces de crecer y sobrevivir a pH por debajo de 4,5-5,0 (Graham *et al.*, 1994). Sin embargo, existen varios trabajos que reportan la ocurrencia y diversidad de cepas de rizobios con capacidad simbiótica en alfalfa en suelos ácidos de Argentina y Uruguay (Castro-Sowinski *et al.*, 2002). Estos autores encontraron cepas medianamente tolerantes a la acidez que pueden crecer hasta pH de 5,5, y cepas tolerantes a la acidez que pueden crecer en pH menores a 5,0. En esta misma línea Baraibar *et al.* (1999) reportaron que el 83% de las cepas nativas-naturalizadas capaces de nodular *Lotus spp.* en Uruguay son tolerantes a la acidez en medios de cultivos con pH 4,5.

Además, pH bajos afectan la disponibilidad de macro y micronutrientes en suelos (Malavolta *et al.*, 1989), entre los cuales se encuentran el Ca y el P necesarios para el proceso de infección y formación de nuevos nódulos. A su vez, estos niveles de pH aumentan la solubilidad de metales como Al, Cu y Mn, lo que también puede afectar la sobrevivencia de rizobios en suelo (Cooper *et al.*, 1983). Adicionalmente, los bajos pH afectan la morfología de las raíces, inhibiendo la formación de pelos radiculares por bajo Ca y alto aluminio e hidrógenos, lo que dificulta el proceso de infección de la planta por parte de la bacteria (Cooper y Scherer, 2012). Por otra parte, algunas de las señales de reconocimiento entre planta-rizobio (inductores flavonoides nod-gen) son específicos para cada rizobio-leguminosa y su producción está afectada por el pH (Hubac *et al.*, 1994). Por todo lo expuesto anteriormente, el encalado de suelos ácidos puede tener un efecto positivo no solo sobre el establecimiento y persistencia de algunas leguminosas, sino sobre el crecimiento de la pastura y la cantidad de N fijado (Peoples y Baldock, 2001).

La salinidad de los suelos es otro factor que afecta la FBN, ya que la mayoría de las leguminosas son sensibles al sodio. Un exceso de sodio tiene un efecto directo sobre el crecimiento de la planta y a su vez impide la interacción entre la bacteria y la planta, afectando el proceso de infección, el número y masa de los nódulos, y actividad de la nitrogenasa (Anthraper y DuBois, 2003).

1.3.2.4 Nutrientes

En general, la disponibilidad de nutrientes en suelo afecta la FBN de manera directa, ya que tiene efecto sobre la sobrevivencia y crecimiento de rizobios, y desarrollo de los nódulos; y de manera indirecta determina el crecimiento y desarrollo de la planta (O'Hara *et al.* 1988, Divito y Sadras 2014, Zheng *et al.* 2019).

Junto al N el P es uno de los principales macronutrientes que limita el crecimiento de las plantas (Sanz-Saez *et al.*, 2017). Las leguminosas que tienen activa fijación de N en comparación con plantas fertilizadas con N, necesitan más P ya que el mismo es requerido para el desarrollo de nódulos y bacteroides (Graham y Vance, 2000). Almeida *et al.* (2000) reportan que con deficiencias severas de P en *T. repens*, se

inhibe la nodulación o se detiene el crecimiento del nódulo según la etapa en la que se produzca la deficiencia. Cuando existe baja concentración de P, el agregado de P tiene un efecto positivo sobre el número, masa y tamaño de los nódulos (Bonetti *et al.*, 1984). Sin embargo, el agregado de P tiene efecto principalmente sobre el N total en planta y no tanto la proporción de N proveniente de la atmósfera (Somado *et al.*, 2006). En leguminosas la concentración de P y N en planta están positivamente correlacionados (Kuang *et al.*, 2005).

La fijación de N es un proceso de alto costo energético para la planta por lo que, frente a la disponibilidad de N mineral en el suelo, la leguminosa disminuye la utilización de N atmosférico. Consecuentemente, existe un mecanismo de regulación de la fijación de N atmosférico en planta, donde la fijación aumenta a medida que hay menores niveles de N mineral disponible en suelo (Ledgard *et al.*, 2009). En etapas tempranas de implantación, la leguminosa requiere de una cantidad de N suficiente (entre semilla y suelo) que permita el crecimiento de la planta en las primeras semanas. Una vez que se forman los nódulos el agregado de fertilizante nitrogenado o la disponibilidad de N mineral en el suelo afectan negativamente la actividad de la nitrogenasa y el número de nódulos (Scherer y Danzeisen, 1980). La magnitud en la reducción de la nodulación y en la actividad del nódulo depende del genotipo y fuente de N, siendo más sensible a nitrato que a amonio (Cooper y Scherer, 2012).

El S afecta el desarrollo y funcionamiento del nódulo, por lo que su agregado cuando es limitante tiene un efecto positivo sobre el número de nódulos en raíces y peso del nódulo (Scherer *et al.*, 2006).

Una adecuada disponibilidad de Ca es importante en etapas tempranas de la nodulación cuando se produce la infección. Una baja concentración de Ca en esa etapa afecta la estructura del nódulo, afectando la posterior fijación de N atmosférico. El agregado de Ca tiene un efecto positivo sobre el número de nódulos (Lowther y Loneragan, 1968) y sobre los compuestos inductores de los genes nod (Richardson *et al.*, 1988).

El estatus de K en la planta afecta directamente la FBN, ya que está involucrado en el crecimiento del nódulo, formación del nódulo y actividad del mismo (Duke *et al.*, 1980); e indirectamente afectando el crecimiento y desarrollo de la leguminosa (Premaratne y Oertli, 1994). Estos últimos autores reportan un aumento en la materia seca, número y peso de nódulos, y en el N total acumulado en planta a medida que se aumentó el suministro de K. Sin embargo, no encontraron efecto sobre la actividad de la nitrogenasa a mayor agregado de K.

1.3.2.5 Relaciones estequiométricas

La utilización de ratios de concentración de N/P en biomasa aérea es ampliamente utilizada como un indicador de la limitante de N o P que pueda estar afectando el crecimiento de las plantas (Güsewell, 2004). Un elemento limitante es aquel que se debe agregar para obtener la máxima producción (Montañés *et al.* 1993, Sinclair *et al.* 1997). Según Güsewell (2004) en términos generales es muy probable que exista respuesta en producción de biomasa a la fertilización nitrogenada cuando la relación N/P en planta es menor a 10, y que exista respuesta en producción de biomasa con fertilización fosfatada cuando esa ratio es mayor a 20. En los rangos intermedios el efecto que pueda tener la fertilización con estos nutrientes en biomasa no siempre se puede explicar con la ratio N/P. Liebisch *et al.* (2013) reportan rangos óptimos de ratio N/P de 5,5 a 9,0 para evaluar el estatus nutricional en pasturas.

La concentración excesiva de un nutriente (K, Mg, Ca o Na) en la solución de suelo puede generar antagonismo con el resto, resultando en deficiencias inducidas por desequilibrios. El K es retenido por la superficie de los coloides del suelo con mayor fuerza que el Na y los cationes divalentes, por lo tanto, el K se lava en menor medida que el Na, Mg y Ca (Jakobsen, 1993).

Cuando hay un desbalance entre las proporciones que existen de cada uno de estos nutrientes en suelo cambian las ratios Mg/K, Ca/K, Ca/Mg, generando un problema para las plantas. Según lo reportado por Loide (2004) las ratios óptimas de Ca/Mg en suelo en los cuales se obtuvieron las mejores producciones de trébol rojo y raigrás

están en valores cercanos a 15/1. A su vez, sostiene que las mayores producciones de trébol rojo se dieron con ratios de K/Mg de 0,7/1 en suelos arcillosos.

Por otro lado, McLean y Carbonell (1972) probaron el efecto de diferentes ratios de Ca, Mg y K en suelo sobre la producción de alfalfa y concluyeron que las máximas producciones se daban con saturaciones de Mg entre 6 y 15%.

1.4. ÍNDICE DE NUTRICIÓN NITROGENADA COMO INDICADOR DE ESTADO NUTRICIONAL DE LAS PLANTAS

1.4.1 Índice de nutrición nitrogenada para C3

La concentración de N en gramíneas C3 puede relacionarse a la producción de biomasa aérea expresada como materia seca de la siguiente manera (Lemaire y Salette, 1984a y 1984b):

$$\%N = a (W)^{-b}$$

Donde W es la materia seca en toneladas por hectárea y %N es la concentración de nitrógeno como porcentaje de la materia seca.

Estos autores con datos de diferentes sitios, años y cultivares, para tapices sin restricción de N proponen coeficientes estables para a y b.

$$\%N = 4,8 (W)^{-0,32}$$

Estos valores ajustados obtenidos para a y b corresponden a condiciones donde la oferta de N fue suficiente para evitar limitaciones de crecimiento por deficiencia del mismo, y no fue excesivo como para evitar consumo de lujo.

La generalización de estos coeficientes a especies no gramíneas como las leguminosas fue testada en pasturas de *Medicago sativa* diferente sitios y periodos de crecimiento por Lemaire *et al.* (1985). Los valores de dichos coeficientes son similares a los obtenidos en gramíneas bien fertilizadas y en aquellos casos donde el crecimiento no estaba limitado por la fijación de N.

La curva (Figura 1) obtenida a partir de la ecuación previamente presentada muestra que a medida que aumenta la materia seca decrece el %N en planta, indicando que, con el crecimiento de la pastura, se acumula N a una tasa relativa, progresivamente más baja que la de C (Lemaire y Gastal, 1997).

El N crítico (%N_c) supone que, a una cierta cantidad de materia seca, una determinada concentración de N en planta es necesaria para obtener la máxima tasa de crecimiento instantánea. Expresado de otra manera, el %N_c puede ser definido como la concentración de N mínima en planta necesaria para alcanzar la máxima tasa de crecimiento de la pastura (Ulrich, 1952).

Hay que destacar que a producciones de materia seca muy bajas (iguales o menores a 1,0 tonelada por hectárea) la ecuación presentada anteriormente arroja valores irreales para %N, por lo que no puede ser utilizada para fases de implantación o rebrote temprano. En estas etapas se puede suponer que el %N óptimo en este periodo es constante e igual al valor del coeficiente a (Lemaire y Gastal, 1997).

Por lo tanto, el %N crítico en planta puede ser estimado en cualquier etapa de crecimiento con alguna de estas ecuaciones.

$\%N = a$ cuando $W < 1,0$ t/ha

$\%N = a(W)^{-b}$ cuando $W > 1,0$ t/ha

Asumiendo que las ecuaciones presentadas anteriormente describen la disminución del %N crítico en planta a medida que aumenta la biomasa aérea, un índice de nutrición nitrogenada (INN) puede ser calculado en cualquier etapa de crecimiento como la ratio entre el %N en planta actual (%N_{act}) y el %N crítico (%N_c) que debe tener la pastura con esa producción, según lo propuesto por Lemaire *et al.* (1989):

$INN = N_{act}/N_c$

Un valor de INN mayor o igual a uno indica que esa pastura crece en una situación no limitante de N, y menor a uno crece en una situación de N limitante. Este índice permite un diagnóstico de la existencia, de una deficiencia o un exceso de N en la

pastura al momento de la observación, y una evaluación de la intensidad de dicha deficiencia (Lemaire y Gastal, 1997).

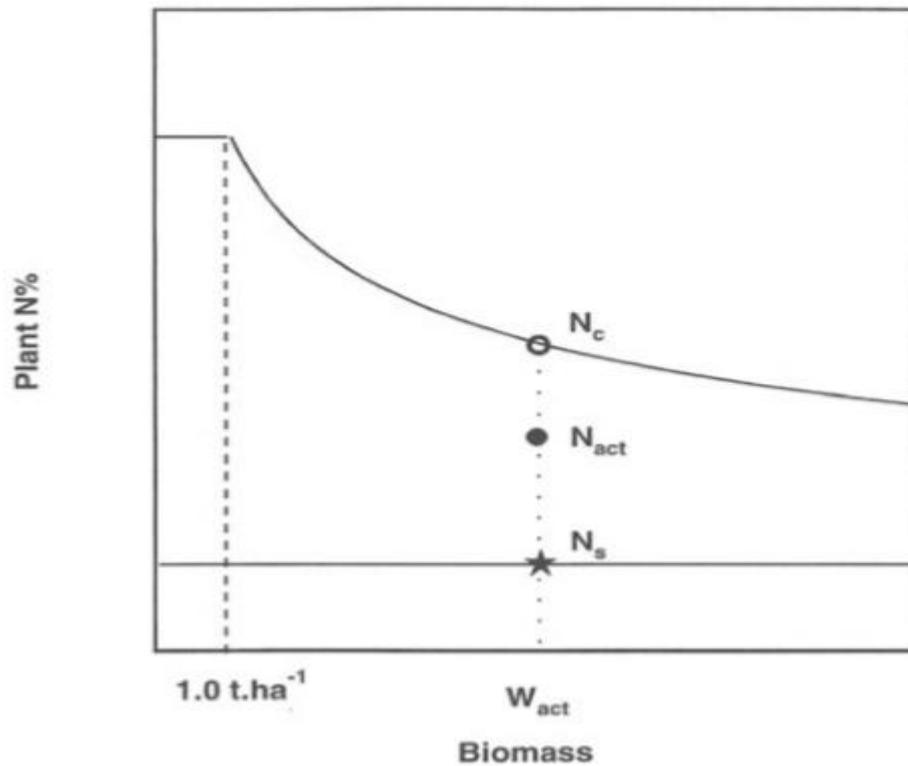


Figura 1. Diagrama para determinación del Índice de nutrición nitrogenada: INN= Nact/Nc (Lemaire y Gastal, 1997).

1.4.2 Índice de nutrición nitrogenada para C4

De la misma manera que para especies C3, se estudió la relación entre la concentración de N en la planta y la producción de biomasa aérea para especies C4. Lemaire y Chartier (1992) proponen la misma curva, pero con diferentes valores de coeficientes a y b.

$$\%N = 3,6 (W)^{-0,34}$$

Donde W es la materia seca en toneladas por hectárea y %N es la concentración de N como porcentaje de la materia seca.

La diferencia entre los valores de los coeficientes para los dos tipos de especies indica que bajo condiciones de N no limitante, las C4 requieren tan solo el 75% del N requerido por especies C3 para la misma producción de materia seca aérea (Lemaire y Gastal, 1997). Esta diferencia entre los coeficientes refleja las diferencias en las vías metabólicas para la asimilación del CO₂ y las diferencias anatómicas de las hojas para estas especies (Brown 1985, Field y Mooney 1986). La mayor concentración de N en planta en especies C3 comparado con especies C4 a una misma producción de materia seca, refleja una mayor concentración de N en los tejidos metabólicos del primero, y una mayor proporción metabólica en oposición a componentes estructurales (Lemaire y Gastal, 1997).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

El objetivo general de esta maestría es comprender la variabilidad en la fijación biológica de nitrógeno de leguminosas forrajeras perennes utilizadas en pasturas sembradas de Uruguay, identificando sus causas y posibles consecuencias nutricionales.

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Cuantificar la variabilidad existente en %Ndfa y kg N fijado/tonelada de MS en las cuatro principales especies de leguminosas forrajeras perennes utilizadas en Uruguay en pasturas sembradas: *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, y *Trifolium pratense*.
- b) Determinar si la variabilidad observada en %Ndfa está asociada a (i) parámetros químicos del suelo (pH, PMN, P, K y CIC); (ii) parámetros de la planta (%N, %P, N/P); (iii) factores de manejo (%leguminosas, fertilización); y (iv) ecorregiones.
- c) Analizar si la variabilidad observada en (a) está asociada al INN de la leguminosa y de las especies no leguminosas asociadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 RELEVAMIENTO: SITIOS, PERÍODO Y MUESTREO

Se realizó un muestreo de alta intensidad espacial en Uruguay (30°-35° S, 53°-58°O) entre octubre y noviembre de 2018, que abarcó 206 pasturas georreferenciadas en todo el país. Incluyó pasturas puras de leguminosa y mezcla leguminosa-gramínea ubicadas en predios comerciales. Se seleccionaron 10-15 predios aleatorios por departamento y se muestrearon pasturas que tuvieran más de un año de implantación.

A continuación, se presenta un mapa (Figura 2) con la ubicación de los sitios muestreados.

Distribución de sitios muestreados

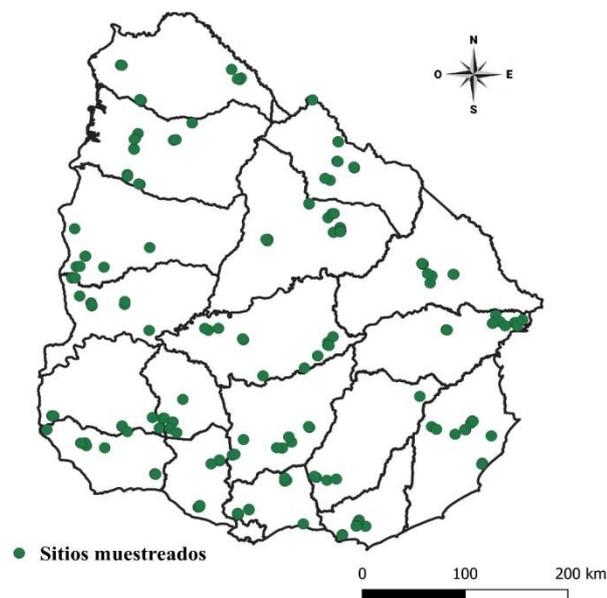


Figura 2. Mapa con sitios muestreados.

En cada pastura se cosechó un marco (marco A) de 20 x 50 cm con leguminosas en el cual se separaron las leguminosas-objetivo (*Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus*, *Medicago sativa*) del resto de las especies (gramíneas o dicotiledóneas). A su vez, se cosechó un segundo marco (marco B) de 20 x 50 cm sin leguminosas (excepto en pasturas de leguminosas puras) en el cual se separaron

las gramíneas de las dicotiledóneas. En ambos marco, los cortes se realizaron al ras del suelo. En cada marco se cuantificó: (i) biomasa verde (kg MS/ha), (ii) concentración de N total (g N/g MS), (iii) relación de isótopos estables de nitrógeno $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) y carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) para todas las especies separadas, y (iv) concentración de P total en leguminosas (g P /g MS).

Asociado a cada marco A se obtuvo una muestra de suelo de profundidad 0-3 cm en la que se determinó pH, y otra de profundidad 0-15 cm en la que se determinaron 12 parámetros químicos de suelo: (i) pH, (ii) P disponible (cítrico), mg/kg, (iii) K intercambiable, meq /100g suelo, (iv) magnesio intercambiable (Mg), meq/100g suelo, (v) calcio intercambiable (Ca), meq/100g suelo, (vi) sodio intercambiable (Na), meq/100g suelo, (vii) acidez titulable (Ac.tit), meq/100g suelo, (viii) bases totales (BT), meq/100g suelo, (ix) porcentaje de saturación de bases (%SB), (x) capacidad de intercambio catiónico a pH 7 (CIC), meq/100g suelo, (xi) carbono orgánico (C.org), g C.org/g suelo, y (xii) potencial de mineralización de nitrógeno (PMN), mg/kg. Las muestras se obtuvieron con un calador de suelo de 40 mm de diámetro y con control de profundidad.

A partir de estas variables medidas en suelo se estimaron las relaciones entre las siguientes bases: magnesio-potasio (Mg/k), calcio-potasio (Ca/k), calcio-magnesio (Ca/Mg), y calcio-magnesio-potasio (Ca + Mg/K). A partir de la concentración de cada una de las bases de suelo y la CIC a pH 7 se calculó la saturación de calcio (% Sat Ca), de sodio (% Sat Na), de potasio (% Sat K), de magnesio (% Sat Mg), y de aluminio (% Sat Al). Además, se determinó un índice de fósforo (IP) e índice de potasio (IK) en suelo de la siguiente manera:

Índice de fósforo (IP)= P cítrico en suelo/ P crítico de la especie leguminosa

Donde P cítrico en suelo es el nivel de P cítrico de ese suelo en mg/kg; y P crítico de la especie leguminosa es el nivel de P cítrico en suelo expresado en mg/kg al cual no hay más respuesta vegetal por parte de la planta en términos producción de biomasa aérea.

Índice de potasio (IK)= K disponible en suelo/ K crítico

Donde K disponible en suelo es el nivel de K expresado en meq/100g de suelo; y K crítico es el nivel de K en suelo expresado en meq/100g al cual no hay más respuesta vegetal por parte de la planta en términos producción de biomasa aérea.

A partir de las variables medidas en planta se estimó el índice de nutrición nitrogenada (INN) para las especies C3 y C4 (ver sección 1.4.1, y 1.4.2), la relación nitrógeno-fosforo (N/P) para las leguminosas, y el porcentaje de leguminosa en la mezcla de la siguiente forma:

$$\% \text{leguminosa} = (\text{g MS leguminosa} / \text{g MS total}) * 100$$

Donde g MS leguminosa son los gramos de materia seca de la leguminosa en el marco y g MS total son los gramos de materia seca total en el marco.

A su vez, en los predios que se contaba con datos se recabó información del manejo de fertilización, de manera de saber la cantidad de N (kg N) y la cantidad de P (kg P) aplicados desde la siembra hasta la fecha del muestreo. Adicionalmente se registró edad de la pastura.

Por último, se estimaron precipitaciones (PP15) y temperatura (Temp15) a nivel del suelo en los 15 días previos al muestreo a partir del satélite Giovanni de la NASA (<https://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/>). Además, se estimó el porcentaje de arcilla (% Arcilla) en el horizonte A de cada sitio a partir del tipo de suelo, utilizando CONEAT y la carta de reconocimientos de suelo del Uruguay.

Para analizar las posibles causas de la variabilidad encontrada en %Ndfa se utilizaron 36 factores potencialmente explicativos relacionados a suelo, planta, manejo de la pastura y ambientales. De los cuales 6 fueron factores relacionados a planta (%P, %N, N/P, d13C, INN, materia seca), 2 a manejo de pastura (EDAD, % leguminosa), 2 ambientales (PP15, Temp 15), y 26 a suelos (P, PMN, CIC, Bases totales, K, Mg, Na, Ca, Al, Ac. titulable, %Sat Al, %Sat K, %Sat Na, %Sat Ca, % Sat Al, %Sat Bases, Ca/K, Mg/K, Ca/Mg, Ca+Mg/K, %Arcilla, pH 0-15, pH 0-3, C.org, Índice de P, Índice de K).

Cabe destacar que no se pudieron utilizar como variables explicativas los dos factores de manejo vinculados a la fertilización (kg N y kg P aplicados) por incertidumbre en el dato proporcionado por el productor.

2.2 ESTIMACIÓN DEL N DERIVADO DE LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA POR MÉTODO DE LA ABUNDANCIA NATURAL DE ¹⁵N

La fracción de N derivada de la fijación simbiótica (% Ndfa) se estimó de la siguiente forma:

$$\%Ndfa = [(\delta^{15}N \text{ referencia} - \delta^{15}N \text{ leguminosa}) / (\delta^{15}N \text{ referencia} - B)] \times 100$$

Donde $\delta^{15}N$ es el enriquecimiento en ¹⁵N expresado en ‰ en relación con el N atmosférico (0,3663‰); $\delta^{15}N$ referencia es el $\delta^{15}N$ de la planta no fijadora teniendo al N del suelo como única fuente nitrogenada; $\delta^{15}N$ leguminosa es el $\delta^{15}N$ de la especie leguminosa; B es el $\delta^{15}N$ de la leguminosa teniendo al N₂ como única fuente de N.

Se tomó la gramínea del marco A como valor de referencia o la dicotiledónea de este mismo marco en aquellos casos donde no había presencia de la primera. Esto se justifica ya que hubo un alto grado de correlación entre las dos especies como se muestra en la figura 1 de anexos. Cuando no existieron gramíneas o dicotiledóneas en el marco A, se utilizó la gramínea del marco B, ya que hubo cierta correlación entre gramínea marco A y gramínea marco B como se muestra en figura 2 anexos. Por último, se utilizó el valor B promedio de tabla por especie según lo reportado por Unkovich *et al.* (2008). Para lotus se utilizó el mismo valor que trébol blanco (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valor B utilizado en método de abundancia ¹⁵N por especie de leguminosa.

B, $\delta^{15}N$ de la leguminosa teniendo al N₂ como única fuente de N.

Especie	B
Alfalfa	-0,90
Lotus	-1,48
Trébol blanco	-1,48
Trébol rojo	-0,94

Fuente: en base a Unkovich *et al.* (2008).

Se descartaron 38 de 357 muestras de leguminosas (10,6%) donde el $\delta^{15}\text{N}$ de la especie referencia era menor a 2‰, ya que el método tiene poca precisión e induce a errores en la estimación del %Ndfa cuando la magnitud del valor de la referencia es menor a 2‰ (Unkovich *et al.*,1994). En figura 3 y 4 de anexos se muestran $\delta^{15}\text{N}$ de la leguminosa y de la especie de referencia utilizada para las 357 leguminosas originales y las 319 leguminosas finalmente utilizadas en el estudio respectivamente.

Finalmente se estimó los kg N fijado/t MS de leguminosa de la siguiente manera:

$$\text{Kg N fijado/t MS} = (\%N/100) * (\%Ndfa/100) * 1000$$

Donde %N es la concentración de nitrógeno en planta expresado como porcentaje y %Ndfa es la proporción de N que proviene de fijación en la leguminosa.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un primer análisis exploratorio de los datos calculando los estimadores estadísticos descriptivos. Posteriormente, se estudió la correlación entre las variables dependientes (%Ndfa y kg N fijados/t MS) y las distintas variables independientes tomadas individualmente (e.g. P, K, pH) con regresiones lineales simples. A su vez, se realizaron análisis con regresiones múltiples para la variable %Ndfa. En una primera instancia se realizó regresiones múltiples para las cuatro especies de leguminosa con cinco factores (pH, PMN, %leguminosa, % N, y N/P). Adicionalmente se probaron estas variables con sus términos cuadráticos y la interacción entre estas variables. En esta instancia se seleccionaron las regresiones con mayor R^2 , las cuales se denominaron modelo básico. En una segunda etapa se le agregó a la regresión del modelo básico dos factores más: índice de P y K. Se probaron también los términos cuadráticos de estas variables. A estas regresiones se le denominó modelo básico P+K. En todos los casos se consideraron las variables estadísticamente significativas con $P < 0,10$. Tercero, se incluyeron 36 variables explicativas vinculadas a factores ambientales, de manejo, suelo y pastura, y se utilizó el método stepwise en R studio para seleccionar las variables que logren explicar la mayor proporción de la variabilidad en el %Ndfa. A estas regresiones se le denominó modelo completo. Finalmente, se estudió la heterogeneidad espacial con

regresiones ponderadas geográficamente (GWR), y la autocorrelación espacial de %Ndfa mediante un test de Moran I.

3. RESULTADOS

3.1 VARIABILIDAD DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA

3.1.1 Porcentaje de nitrógeno derivado del aire

La media general de %Ndfa para todas las leguminosas fue de 76% con un desvío estándar de 19%, siendo para alfalfa, lotus, trébol blanco y trébol rojo de 63 ± 16 ; 76 ± 20 ; 75 ± 19 y $84 \pm 13\%$ respectivamente. Se observó diferente variación en %Ndfa según la especie (Figura 3). Lotus, trébol blanco y rojo alcanzaron valores del 100% de %Ndfa correspondientes al cuartil 25% superior. Sin embargo, en el cuartil 25% inferior trébol rojo presentó la menor dispersión alcanzando valores mínimos de 60%, mientras que lotus y trébol blanco presentaron valores incluso por debajo de 40%. Para trébol rojo los valores contenidos entre el percentil 25 y 75, donde se concentra el 50% de los datos, se ubicaron por encima del resto de las especies y con menor dispersión. Por otro lado, en el cuartil 25% superior de la alfalfa se observó una menor dispersión de valores, pero con máximos que no superaron el 90%. A su vez, presentó el mayor rango intercuartílico (IQR), la menor mediana, y valores mínimos en el percentil 25% inferior similares a trébol blanco y lotus. Los IQR fueron de 24, 21, 20 y 17% para alfalfa, lotus, trébol blanco y trébol rojo respectivamente.

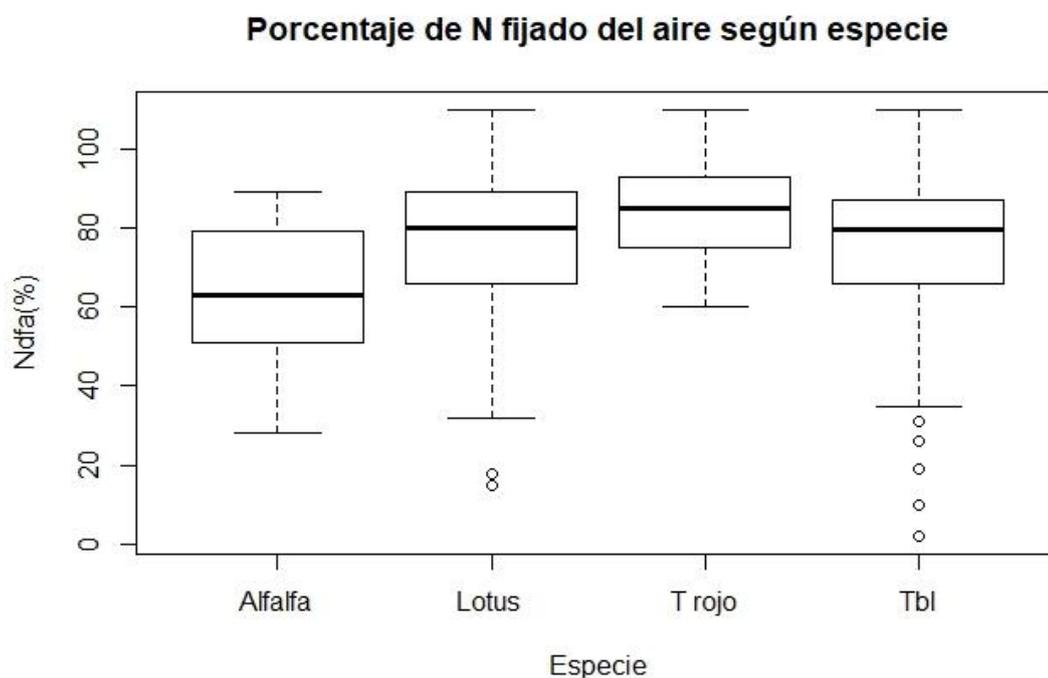


Figura 3. Variabilidad en el porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa).

3.1.2 Kilogramos de N por tonelada de materia seca aérea

La media general de kg N fijado/t MS para todas las leguminosas fue de 27 kg con un desvío estándar de 8 kg, siendo para alfalfa, lotus, trébol blanco y trébol rojo de 22 ± 8 ; 27 ± 8 ; 26 ± 7 y 28 ± 7 kg respectivamente. La variabilidad de los kg de N fijado/t MS fue diferente según la especie, aunque menos marcada (Figura 4). El trébol rojo tanto para el cuartil 25% superior como para el cuartil 25% inferior alcanzó los valores más altos en comparación con el resto de las especies con una menor dispersión de los datos. Para alfalfa, lotus y trébol blanco la dispersión entre los valores máximos y mínimos de esta variable fue similar, pero se diferencian en la magnitud y dispersión de los datos que se encuentran entre el percentil 25 y 75. Alfalfa presentó la menor mediana y mayor dispersión entre estos percentiles (mayor IQR), mientras que lotus y trébol blanco presentaron similar mediana, pero esta última especie menor dispersión entre percentiles 25 y 75.

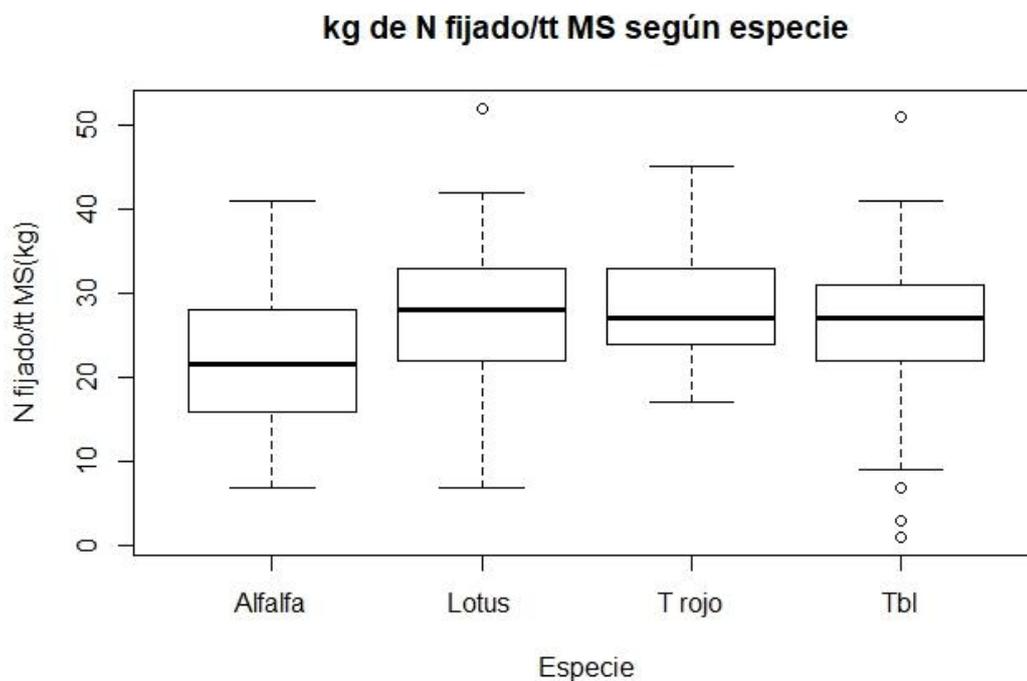


Figura 4. Variabilidad en los kilogramos de N fijado por tonelada materia seca (kg N fijado/t MS).

3.1.3 Relación entre kg N fijado/t MS y %Ndfa

La variable kg N fijados/t MS está compuesta por %N en planta y el %Ndfa. En la Figura 5 se muestra la relación entre kg N fijados/t MS y %Ndfa en planta. El R^2 entre estas dos variables fue de 0,47, 0,56, 0,63 y 0,18 para alfalfa, lotus, trébol blanco y rojo respectivamente.

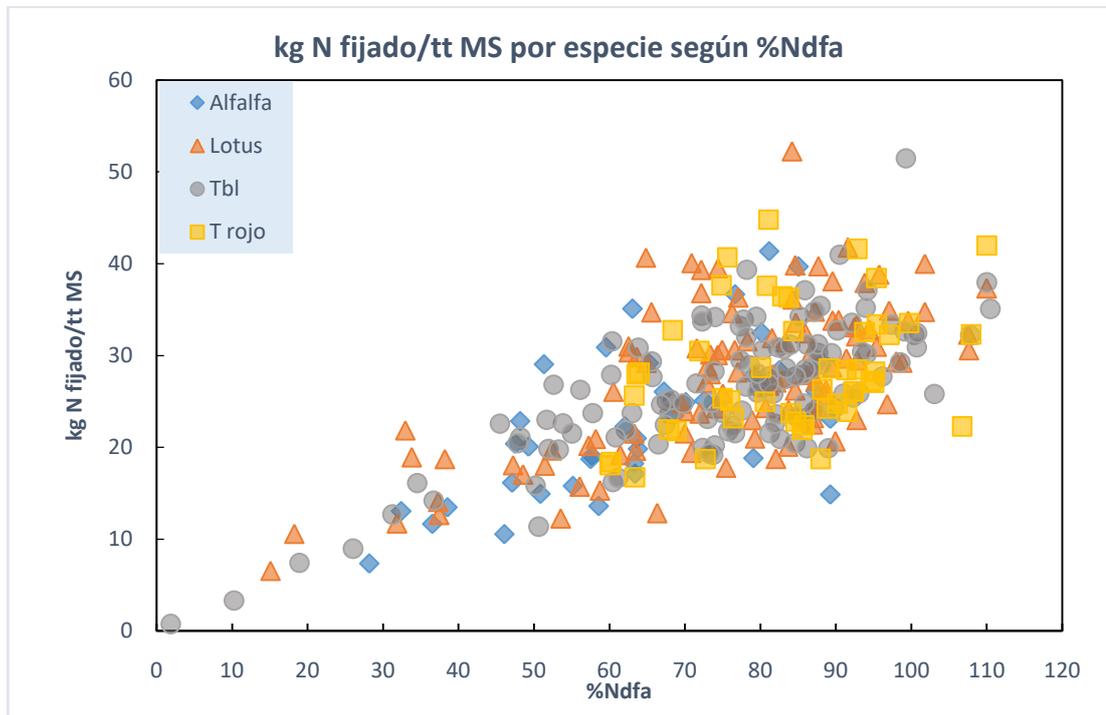


Figura 5: Kg N fijado/t MS por especie según %Ndfa.

3.2 POSIBLES CAUSAS DE LA VARIABILIDAD EN FBN

Para identificar los principales factores que afectan el %Ndfa se utilizaron las regresiones múltiples. En una primera instancia se incluyeron 5 variables vinculados a factores ampliamente reportados en la bibliografía con efecto sobre el %Ndfa. Dentro de estos factores se incluyeron: competencia (%leguminosa), acidez del suelo (pH), disponibilidad de N (PMN), y relación N-P en planta (N/P). Posteriormente, estas mismas variables se probaron con sus términos cuadráticos, y se seleccionaron aquellas que mejoraban el coeficiente de determinación y tenían sentido biológico. También se testearon posibles interacciones entre variables. Al resultado de este análisis se le denominó modelo básico.

En una segunda instancia se le incluyó a la regresión del modelo básico dos variables vinculadas a la disponibilidad de los principales macronutrientes en suelo: índice P e índice K. Luego se testearon sus términos cuadráticos, y finalmente no se incluyeron. Al resultado de estas regresiones se le llamó modelo básico P+K. Además, se utiliza el método de stepwise con 36 variables vinculadas a suelo, planta, manejo y ambiente para testear que proporción máxima de la variabilidad encontrada en

%Ndfa puede ser explicado por este modelo. A estas regresiones se le llamó modelo completo. Finalmente, dichas regresiones se compararon con regresiones geográficamente ponderadas para testear heterogeneidad espacial y autocorrelación de %Ndfa.

En el cuadro 2 se presentan la magnitud y el sentido del efecto que cinco factores relacionados a suelo y planta tuvieron en regresiones múltiples sobre %Ndfa (modelo básico). Tanto % leguminosas, %N en planta como PMN tuvieron un efecto negativo sobre %Ndfa, siendo estadísticamente significativa para todas las especies exceptuando PMN para alfalfa. No se encontró interacción con significancia estadística entre PMN-%leguminosa para ninguna de las cuatro especies estudiadas, y la única especie que presentó una significancia estadística para %N-%leguminosa fue alfalfa. En el cuadro 3 se presentan los valores promedios, mínimos y máximos para las cinco variables utilizadas en el modelo básico de las cuatro especies de leguminosas incluidas en este estudio.

En las figuras 6, 7 y 8 se presenta de forma gráfica el efecto de % leguminosas, % N planta y PMN sobre el %Ndfa para las distintas especies. Para lograr visualizar estos efectos se utilizaron las regresiones del modelo básico para cada una de las especies, dejando un valor constante e igual a la media en cada variable independiente de la regresión, y únicamente modificando el valor de una de las variables independientes a la vez; utilizando el rango de valores para esa variable que se encontró en el muestreo; y obteniendo así la forma de respuesta en términos de %Ndfa. En los gráficos de las variables %leguminosa y %N se divide alfalfa en alta y baja concentración de N en planta de manera de poder visualizar la interacción %leguminosa-%N. Lotus y trébol rojo presentaron similar sensibilidad al incremento del % de leguminosa (Figura 6) en términos de %Ndfa, al incrementar el primero disminuye el %Ndfa de manera lineal y con similar pendiente. Esta respuesta es similar para trébol blanco, pero con menor pendiente. Por otro lado, lotus y trébol blanco tienen una mayor disminución en el %Ndfa por unidad de incremento del PMN en suelo y del %N en planta que trébol rojo (Figura 7 y 8).

Cuadro 2. Modelo básico: magnitud y sentido del efecto de cinco factores relacionados a suelo y planta en regresiones múltiples sobre %Ndfa.

Factor	Alfalfa		Trébol rojo		Trébol blanco		Lotus	
	Coefficiente	Signo	Coefficiente	Signo	Coefficiente	Signo	Coefficiente	Signo
Leguminosa (%)	0,89	(-)	0,22	(-)	0,14	(-)	0,18	(-)
N (%)	25,9	(-)	7,66	(-)	11,05	(-)	9,03	(-)
PMN (ppm)	0,11	(-)	0,05	(-)	0,13	(-)	0,16	(-)
pH (0-15) y pH ²	13,5-1,2	(+)(-)	9,6-0,4	(+)(-)	58,0-4,3	(+)(-)	41,6-2,6	(+)(-)
N:P y N:P ²	6,4-0,20	(+)(-)	7,0-0,27	(-)(+)	9,8-4,3	(+)(-)	0,9-0,01	(+)(-)
N*Leguminosa	0,27	(+)
R²	0,23		0,42		0,34		0,44	

*En negro factores estadísticamente significativos ($p \leq 0,1$), en azul factores con tendencia ($0,1 > p \geq 0,2$) y en gris factores no significativos ($p > 0,2$).

Cuadro 3. Valor promedio, mínimos y máximos de las variables utilizadas en el modelo básico para las cuatro leguminosas en este estudio.

Factor	Alfalfa	Trébol rojo	Trébol blanco	Lotus
Leguminosa (%)	82 (14-100)	47 (2-100)	51 (2-100)	55 (2-100)
N (%)	3,6 (1,7-5,7)	3,4 (2,1-5,5)	3,5 (2,2-5,2)	3,7 (1,9-6,6)
PMN (ppm)	65 (28-135)	68 (14-185)	68 (16-189)	73 (23-186)
pH (0-15)	6,1 (5,1-8,0)	5,7 (4,9-8,5)	5,7 (4,9-8,5)	5,8 (4,9-7,5)
N:P	14 (8-25)	16 (7-29)	15 (8-30)	15 (8-20)

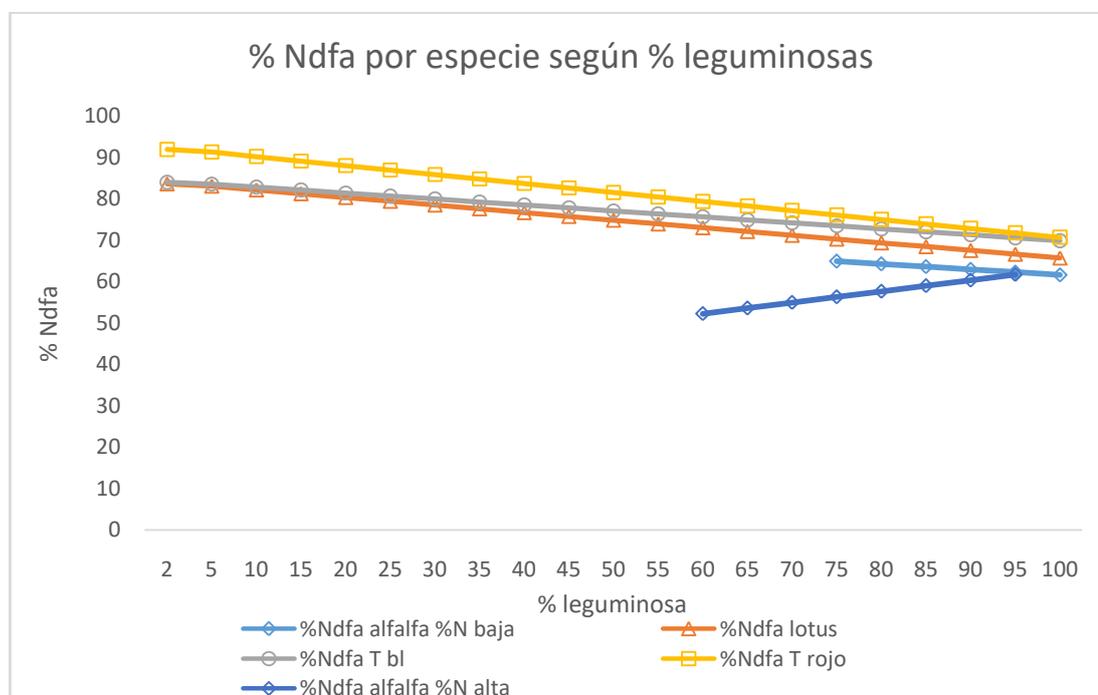


Figura 6. Porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa) por especie según porcentaje de leguminosas (%leguminosas) en la mezcla. Línea entera estadísticamente significativa o con tendencia ($p \leq 0,2$), línea punteada estadísticamente no significativa ($p > 0,2$).

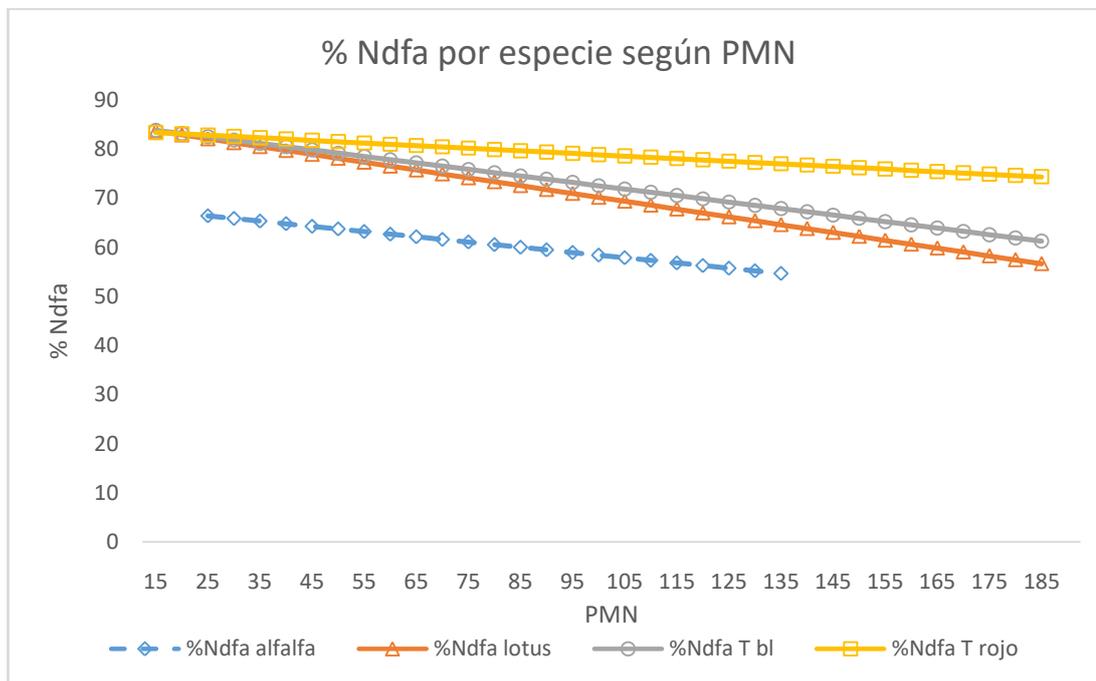


Figura 7. Porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa) por especie según potencial de mineralización en los primeros 15 cm de suelo. Línea entera estadísticamente significativa o con tendencia ($p \leq 0,2$), línea punteada estadísticamente no significativa ($p > 0,2$).

Para el factor N/P existió una respuesta no lineal para %Ndfa (Figura 9) en el caso de alfalfa y trébol blanco, en la cual aumentos en las relaciones de N/P por encima de 16 resultan en decrecimientos graduales del %Ndfa. Para las distintas relaciones de N/P la alfalfa presenta menores valores de %Ndfa que trébol blanco. Incluir el factor N/P elevado al cuadrado en el modelo permite mejorar el R^2 de la regresión de 0,14 a 0,23 y de 0,25 a 0,34 en alfalfa y trébol blanco respectivamente. Por otro lado, trébol rojo también presentó una asociación no lineal entre N/P y %Ndfa, donde los mínimos se encuentran entre los rangos de ratios N/P 12-14. Incluir el factor N/P elevado al cuadrado en el modelo permite mejorar el R^2 de la regresión de 0,38 a 0,42 en trébol rojo. Lotus presentó una relación lineal con efecto de sentido directo entre N/P y %Ndfa.

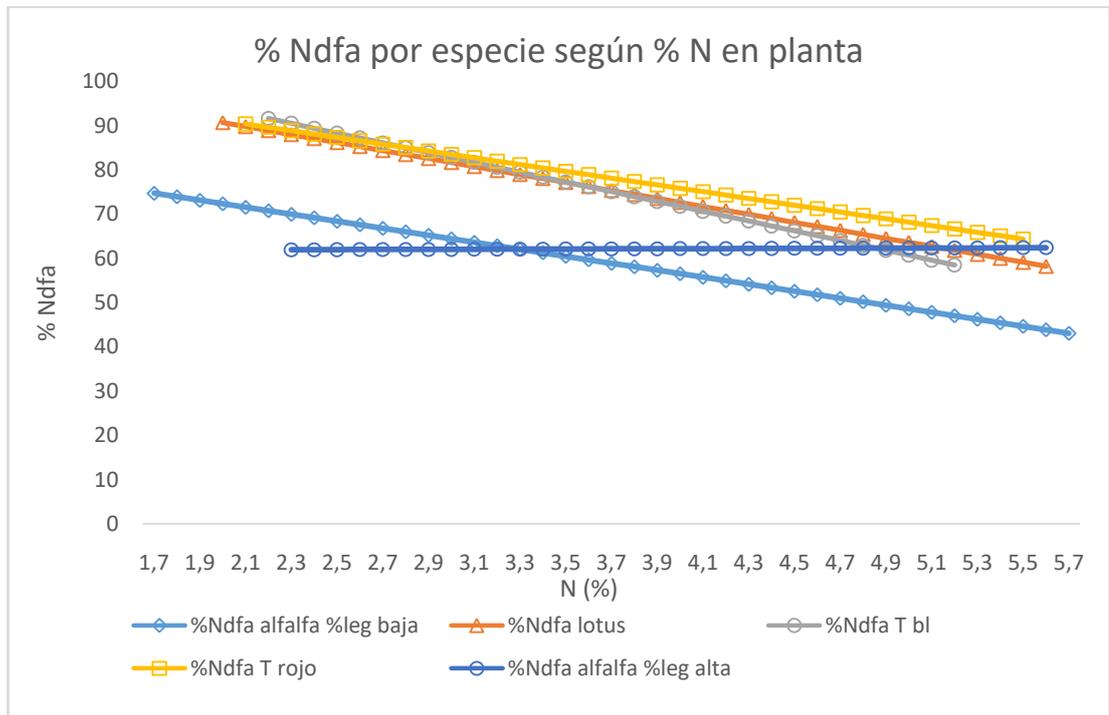


Figura 8. Porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa) por especie según porcentaje de nitrógeno en planta (%N). Línea entera estadísticamente significativa o con tendencia ($p \leq 0,2$), línea punteada estadísticamente no significativa ($p > 0,2$).

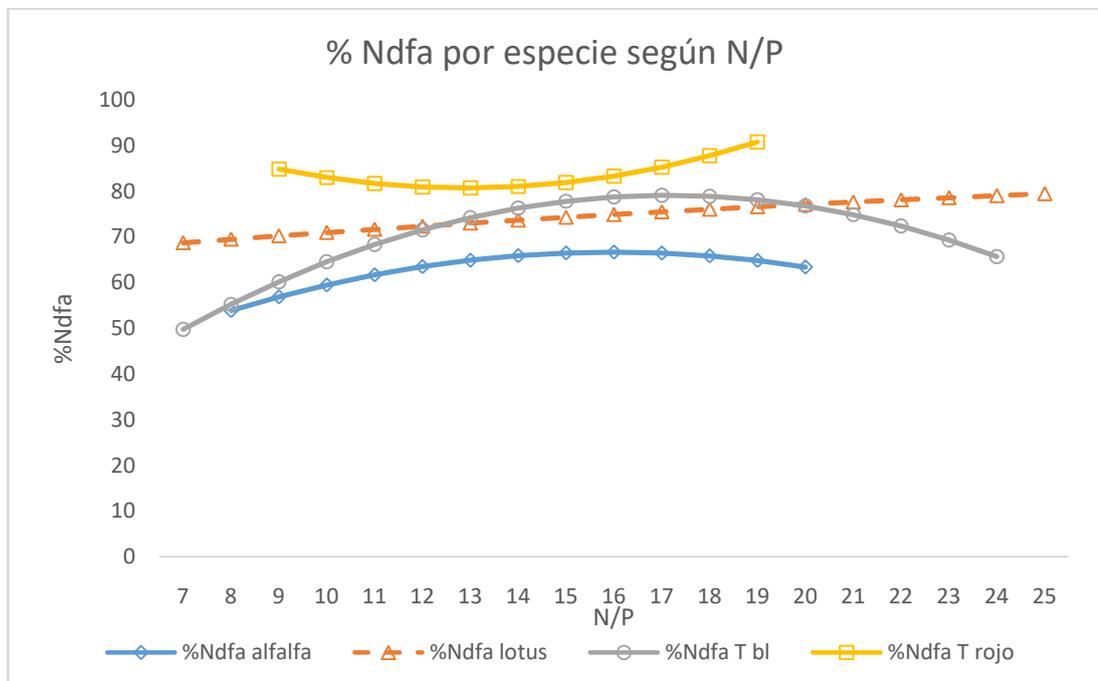


Figura 9. Porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa) por especie según relación nitrógeno-fósforo en planta (N/P). Línea entera estadísticamente significativa o con tendencia ($p \leq 0,2$), línea punteada estadísticamente no significativa ($p > 0,2$).

Para el factor pH existió una respuesta cuadrática para %Ndfa (Figura 10) en el caso de trébol blanco, en la cual el incremento de respuesta obtenida por unidad de incremento de pH disminuye a medida que %Ndfa se acerca a su máximo, aumentos posteriores de pH resultan en decrecimientos graduales del %Ndfa. Dichos máximos se alcanzaron con pH de 6,5. Incluir el factor pH elevado al cuadrado en el modelo permite mejorar el R^2 de la regresión de 0,30 a 0,34 en trébol blanco. Por otro lado, lotus y trébol rojo presentaron una asociación lineal positiva entre pH y %Ndfa, y alfalfa mostró una curva donde no hay respuesta en %Ndfa a medida que hay incrementos de pH hasta un valor de 6,2 después del cual hay decrecimientos graduales de %Ndfa.

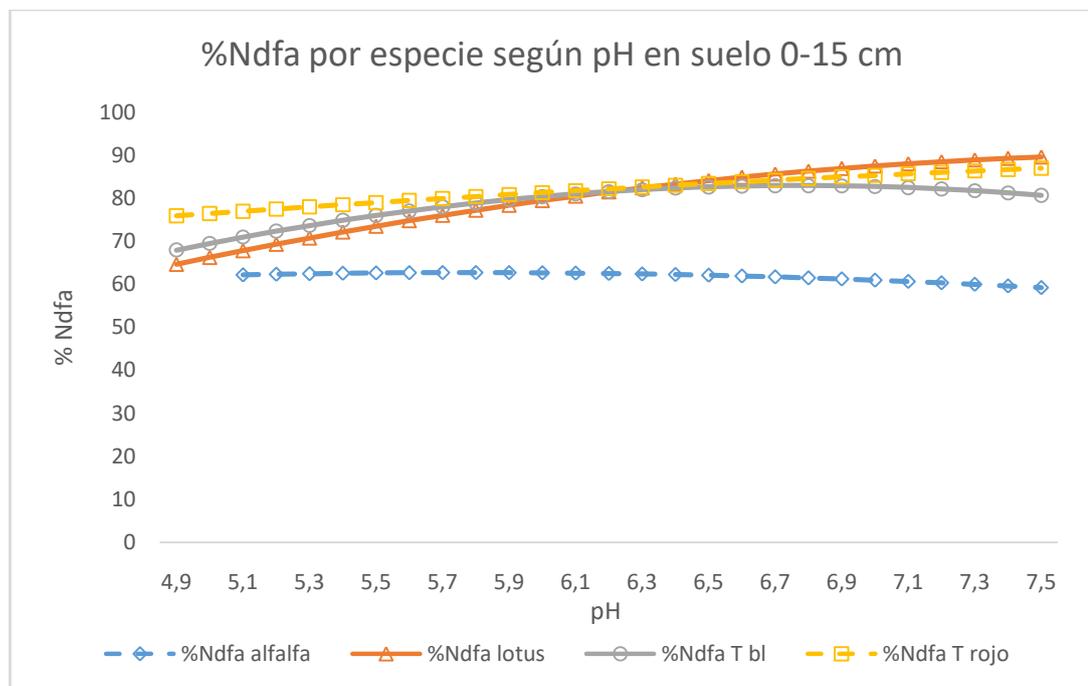


Figura 10. Porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa) por especie según pH en los primeros 15cm de suelo. Línea entera estadísticamente significativa o con tendencia ($p \leq 0,2$), línea punteada estadísticamente no significativa ($p > 0,2$).

Cuando se le agregó al modelo dos factores (modelo básico P+K) vinculados a la disponibilidad de P y K, reportados en la bibliografía como los principales nutrientes (exceptuando N) que tienen efecto sobre la fijación biológica, lograron incrementos de 0,01 a 0,19 en los coeficientes de determinación según la especie (ver cuadro 4). El índice P en suelo tuvo un efecto positivo sobre %Ndfa para alfalfa y trébol blanco,

pero no significativa para la última especie. Para trébol rojo y lotus esta misma variable tuvo un efecto negativo sobre %Ndfa con significancia estadística en ambas especies. El índice de K suelo presentó un efecto negativo sobre %Ndfa para alfalfa y trébol blanco, con significancia y tendencia estadística respectivamente. Para lotus y trébol rojo esta variable tuvo un efecto positivo sobre %Ndfa, pero sin significancia estadística en la última especie. Cabe destacar que en las cuatro especies el índice de P y el índice de K tienen signos opuestos. Los índices elevados al cuadrado si bien lograron incrementar el coeficiente de determinación de la regresión, con esto no fue posible inferir una explicación biológica (no se presentan resultados).

Cuadro 4. Modelo básico P+K: magnitud y sentido del efecto de siete factores relacionados a suelo y planta en regresiones múltiples sobre %Ndfa.

Factor	Alfalfa		Trébol rojo		Trébol blanco		Lotus	
	Coefficiente	Signo	Coefficiente	Signo	Coefficiente	Signo	Coefficiente	Signo
Leguminosa (%)	1,23	(-)	0,20	(-)	0,16	(-)	0,19	(-)
N (%)	36,0	(-)	6,9	(-)	11,0	(-)	8,3	(-)
PMN (ppm)	0,12	(-)	0,06	(-)	0,11	(-)	0,18	(-)
pH (0-15) y pH ²	34,5-2,9	(-)(+)	16,7-1,0	(+)(-)	69,7-5,2	(+)(-)	35,5-2,2	(+)(-)
N:P y N:P ²	8,2-0,2	(+)(-)	9,5-0,3	(-)(+)	9,7-0,3	(+)(-)	0,3-0,01	(+)(-)
Índice P suelo	0,68	(+)	0,57	(-)	0,43	(+)	2,7	(-)
Índice K suelo	14,32	(-)	2,8	(+)	7,5	(-)	9,8	(+)
N*Leguminosa	0,35	(+)
R²	0,42		0,50		0,35		0,48	

*En negro factores estadísticamente significativos ($p \leq 0,1$), en azul factores con tendencia ($0,1 > p \leq 0,2$) y en gris factores no significativos ($p > 0,2$).

Por último cuando se agregó a los siete factores de la regresión 29 factores adicionales, estos 36 factores (modelo completo) vinculados a características químicas de suelo, de planta, a factores de manejo y ambientales lograron incrementos de 0,0 a 0,62 en los coeficientes de determinación según la especie (ver cuadro 5). Se mantuvieron PMN, %N en planta y % leguminosa como variables explicativas con efecto negativo sobre %Ndfa en lotus, trébol blanco y rojo. En alfalfa, de estas tres variables solamente fue significativa %leguminosa con efecto negativo sobre %Ndfa y la interacción %N-%leguminosa con efecto positivo sobre %Ndfa. La relación N/P en planta se mantuvo solamente en trébol rojo. En alfalfa, lotus y trébol blanco fue sustituido por otros factores vinculados a la disponibilidad de NP como %N en planta, índice P o P cítrico en suelo. En cuanto al pH, apareció como significativo para trébol rojo en los primeros 3 cm de suelo, en lotus en la

porción de 3 a 15 cm de suelo, y en alfalfa solamente el término cuadrático de pH 0-15 como factor vinculado a la acidez del suelo. En alfalfa se incorporaron como significativos factores relacionados a disponibilidad de bases o la relación entre las mismas. Las variables ambientales fueron únicamente significativas en alfalfa, y las de textura de suelo significativas para alfalfa y lotus.

Cuando se utilizaron regresiones geográficamente ponderadas (GWR) las mismas tuvieron el mismo R^2 ajustado que las regresiones del modelo completo, es decir existe poca heterogeneidad espacial por lo que no se justifica la utilización de GWR. Además no hubo autocorrelación (I de Moran p -valor > 0,05) para la variable %Ndfa, se distribuye de manera aleatoria entre las entidades del área de estudio.

Cuadro 5. Modelo completo: sentido del efecto de cada factor sobre %Ndfa para leguminosas: alfalfa (n=38), lotus (n=100), trébol blanco (n=111) y trébol rojo (n=43).

Ndfa, Nitrógeno derivado del aire; N, nitrógeno; P, fósforo; PMN, potencial de mineralización del nitrógeno; K, potasio; Ca, calcio; Na, sodio; Mg, magnesio; INN, índice nutrición nitrogenada; MS, materia seca; C.org, carbono orgánico; PP15, precipitaciones 15 días previo al muestreo; Temp 15, temperatura media al ras del suelo 15 días previo al muestreo.

Factor	Alfalfa	Lotus	Trébol blanco	Trébol rojo
Manejo				
Leguminosa (%)	(-)	(-)	(-)	(-)
MS (ton)	(+)			
C.org (%)	(-)			
Disponibilidad NP				
PMN (ppm)		(-)	(-)	(-)
N/P				(-)
N/P ²				(+)
P Cítrico (ppm)		(-)		(-)
N (%)		(-)	(-)	(-)
Índice P	(+)			
N*Leguminosa	(+)			
Acidez				
pH 03				(-)
pH2 015	(+)			
pH 315		(+)		
Nutrientes				
Índice de K	(+)			
Mg/K	(-)			
Ca+Mg/k	(+)			
Saturación Ca (%)	(-)			
Saturación Al (%)				(-)
Saturación K (%)	(-)			
Saturación Mg (%)				(-)
Saturación Na (%)	(+)			
K (meq /100 g)		(+)		
Ambientales				
PP15	(+)			
Temp 15	(-)			
Arcilla	(+)	(-)		
R²	0,85	0,51	0,22	0,57

A partir de las ecuaciones básicas y básicas P+K presentadas en los cuadros 2 y 4, se calcularon los valores predichos de %Ndfa. Posteriormente se compararon estos valores con los valores de %Ndfa observados reales (Figura 11 y 12), y se estimó el error medio absoluto (EMA) para cada modelo.

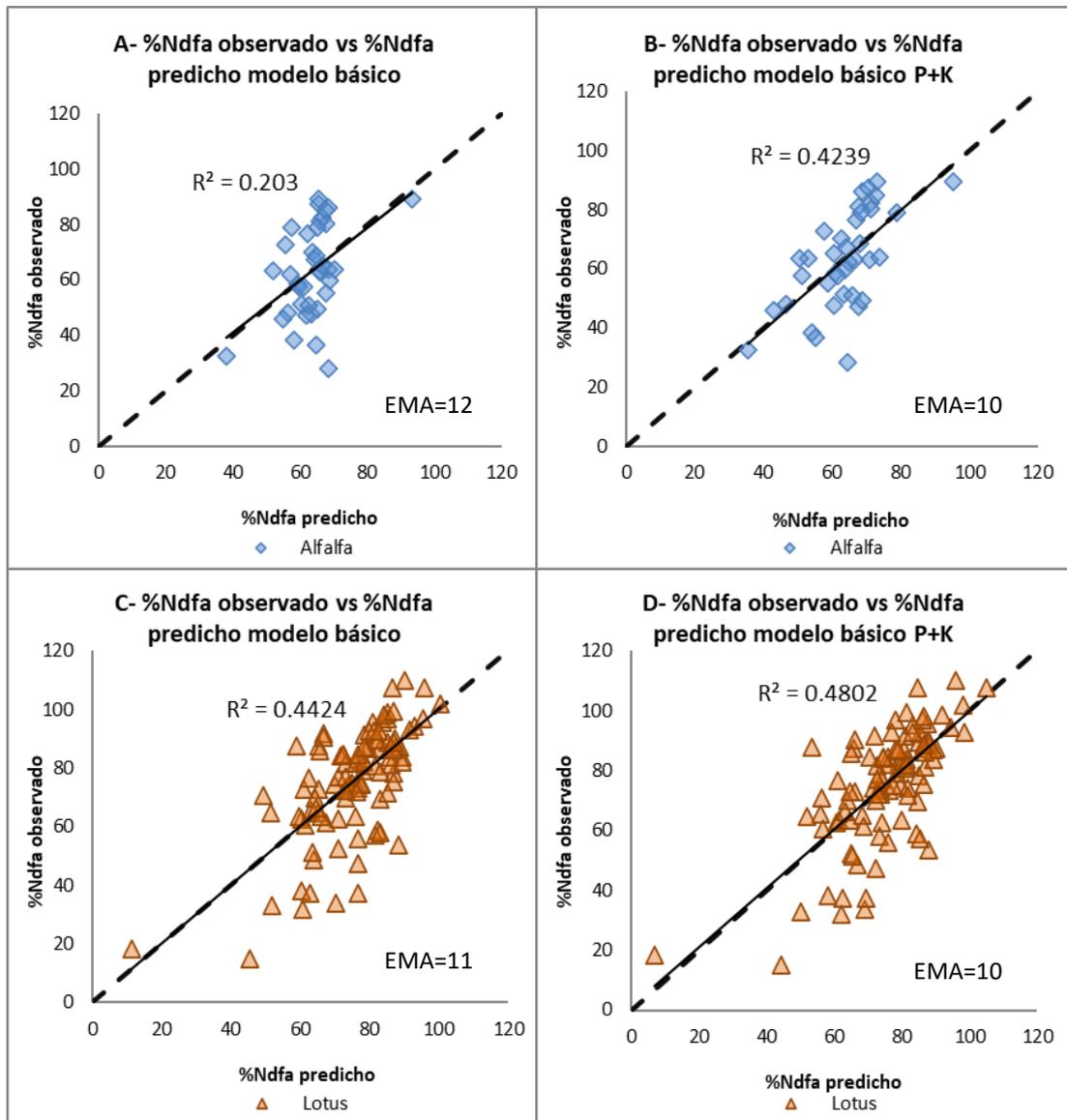


Figura 11. Dispersión de valores de %Ndfa observados en función de los predichos por el modelo básico para alfalfa (A) y lotus (C). Dispersión de valores de %Ndfa observados en función de los predichos por el modelo básico P + K para alfalfa (B) y lotus (D). Línea punteada 1:1.

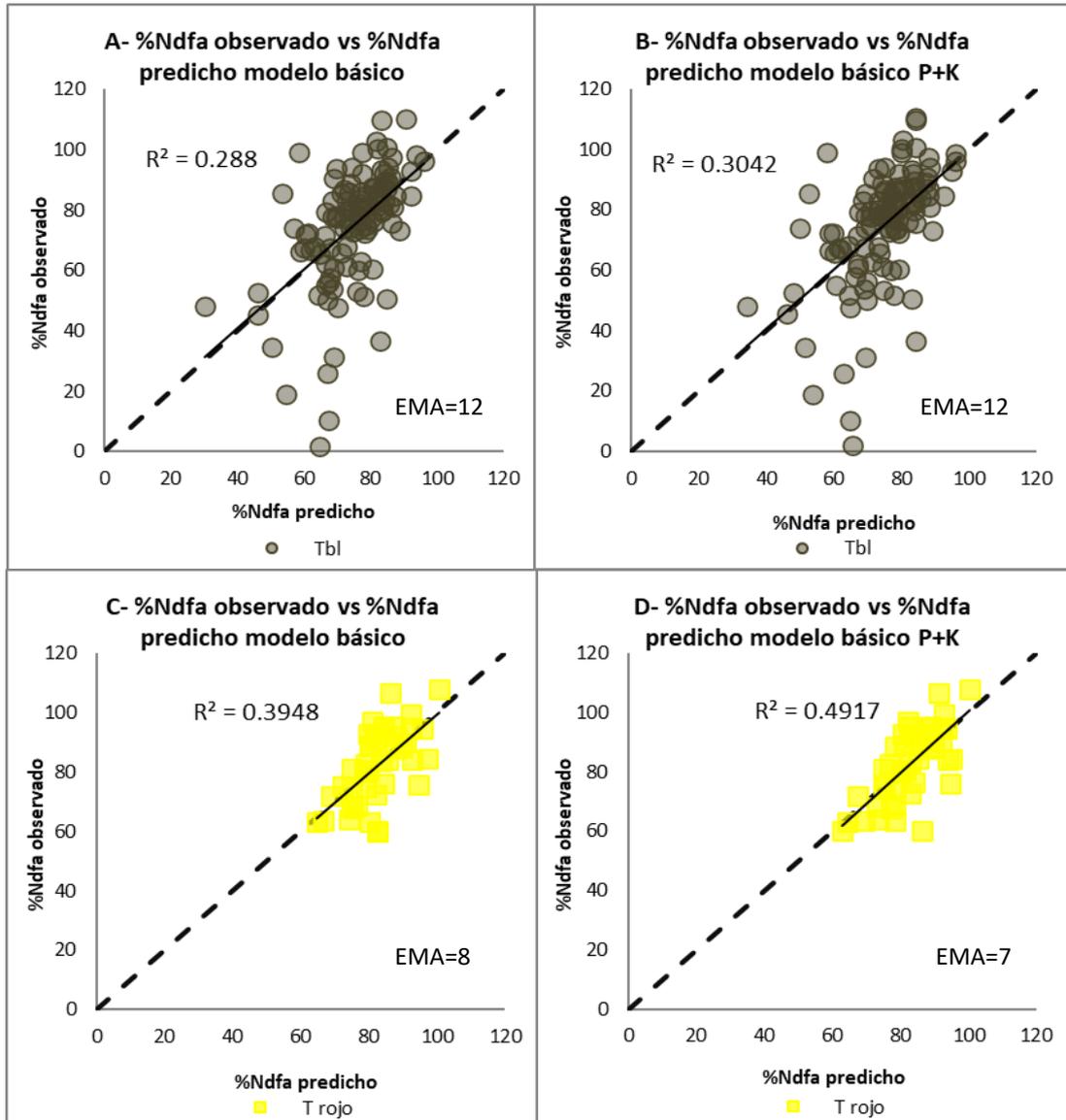


Figura 12. Dispersión de valores de %Ndfa observados en función de los predichos por el modelo básico para trébol blanco (A) y trébol rojo (C). Dispersión de valores de %Ndfa observados en función de los predichos por el modelo básico P + K para trébol blanco (B) y trébol rojo (D). Línea punteada 1:1.

En lotus y trébol blanco, tanto para el modelo básico como para el modelo básico P+K, existieron casos donde los valores predichos de %Ndfa superan por más de 30 puntos porcentuales el valor observado. Como se mencionó anteriormente, no fue posible utilizar como variable explicativa los kg N fertilizados por incertidumbre en el dato recabado, pero sí fue posible separar pasturas con uso frecuente de urea de aquellas sin fertilización nitrogenada. En la cuadro 6 se presenta los valores del EMA cuando se utiliza el modelo básico en pasturas con y sin aplicaciones de urea. Además se presenta el %Ndfa, el $\delta^{15}\text{N}$ de la especie referencia y de la leguminosa para los grupos con y sin urea. En lotus y trébol blanco aumenta el EMA y disminuye el %Ndfa cuando hay aplicaciones de urea.

Cuadro 6. %Ndfa, $\delta^{15}\text{N}$ de la especie referencia y leguminosa, y error medio absoluto del modelo básico cuando se dividen los datos según recibieron o no aplicaciones de urea.

		Alfalfa	Lotus	Trébol blanco	Trébol rojo	Leguminosas
UREA						
NO	EMA	12	10	9	7	10
	n	30	73	78	31	212
	%Ndfa	64	78	77	82	76
	$\delta^{15}\text{N}$ referencia	3,5	4,0	4,4	4,4	4,2
	$\delta^{15}\text{N}$ leguminosa	0,8	-0,2	-0,1	0	0
SI	EMA	11	14	18	8	14
	n	8	27	32	12	80
	%Ndfa	62	68	68	84	70
	$\delta^{15}\text{N}$ referencia	4,0	4,2	4,3	3,6	4,1
	$\delta^{15}\text{N}$ leguminosa	1,1	0,4	0,4	-0,2	0,4

*EMA: Error medio absoluto. n: Número de muestras. %Ndfa: porcentaje de nitrógeno derivado del aire. $\delta^{15}\text{N}$ referencia: Delta ^{15}N especie de referencia. $\delta^{15}\text{N}$ leguminosa: Delta ^{15}N leguminosa.

Finalmente cuando se compararon las especies leguminosas dentro del mismo marco (Figura 13), bajo las mismas condiciones de suelo, algunas presentaron diferente %Ndfa frente a su competidora. El trébol blanco fue capaz de utilizar un igual o mayor %Ndfa que alfalfa en más del 90% de los casos cuando estuvieron bajo las mismas condiciones de crecimiento. A su vez trébol blanco obtuvo valores superiores de %Ndfa que lotus solamente en aquellos casos que este último no alcanzaba el 50% de N derivado del aire. En cambio el trébol blanco en mezclas con trébol rojo fue superado o igualado en %Ndfa en el 78% de los casos. A su vez,

trébol rojo logró %Ndfa iguales o superiores en más del 85% de los casos cuando se lo comparó con lotus. Para la combinación de especies trébol rojo-alfalfa se relevaron sólo cuatro casos, en los cuales el trébol rojo alcanzó valores de %Ndfa similares o superiores a la otra especie.

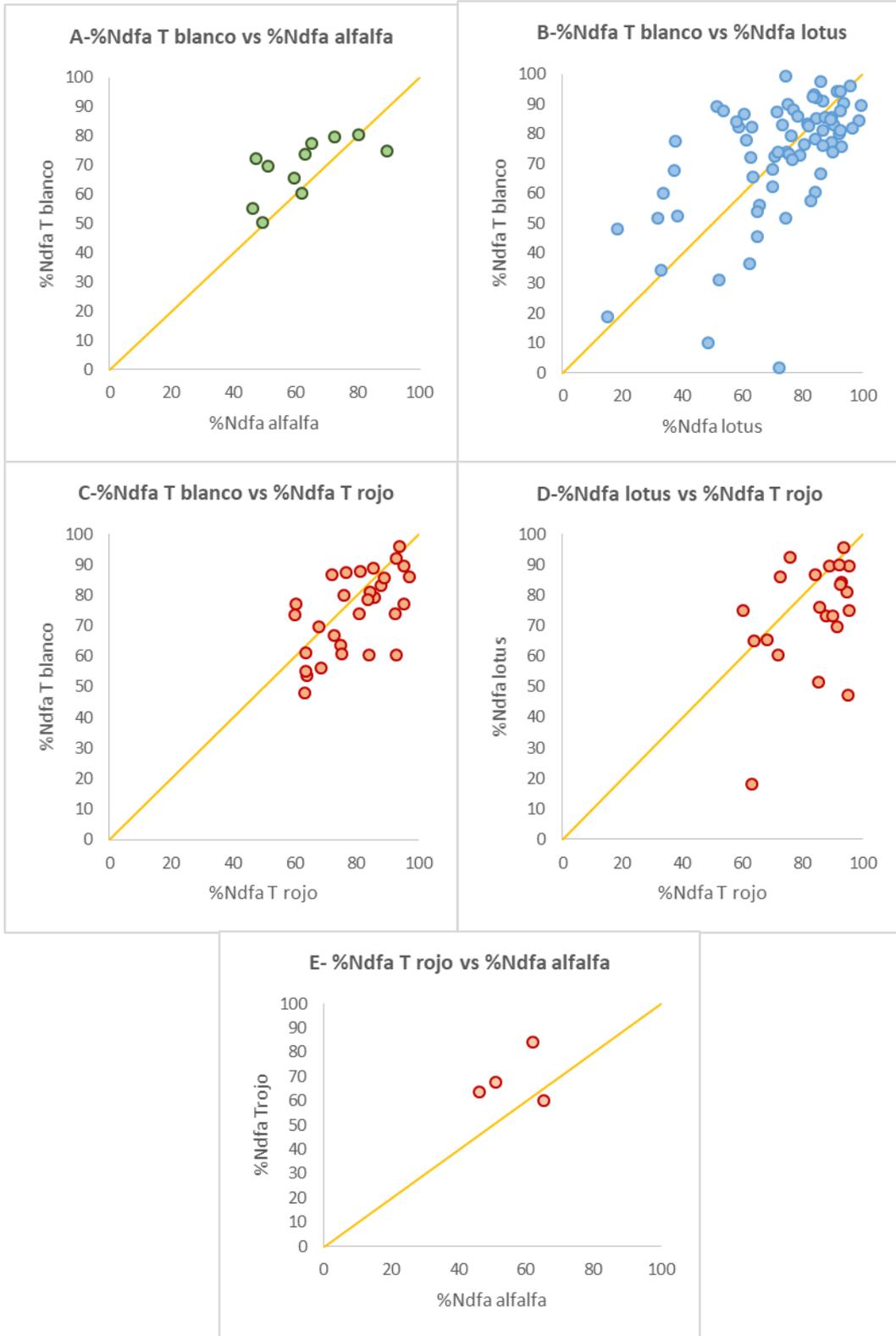


Figura 13. A. Porcentaje de N que proviene del aire (%Ndfa) de trébol blanco según %Ndfa de alfalfa cuando se encuentran en mezcla. B. %Ndfa de trébol blanco según %Ndfa de lotus cuando se encuentran en mezcla. C. %Ndfa de trébol blanco según %Ndfa de trébol rojo cuando se encuentran en mezcla. D. %Ndfa de lotus según %Ndfa de trébol rojo cuando se encuentran en mezcla. E. %Ndfa de trébol rojo según %Ndfa de alfalfa cuando se encuentran en mezcla.

3.3 CONSECUENCIAS DE LA VIARIABILIDAD DE LA FBN SOBRE NUTRICIÓN NITRÓGENADA DE LA PLANTA

En el cuadro 7 se presenta el INN promedio y el desvío estándar de las leguminosas y su especie acompañante no leguminosa.

Cuadro 7. Índice de nutrición nitrogenada y su desvío estándar por especie y total.

Leguminosa	INN leg		INN aco	
	Promedio	SD	Promedio	SD
Alfalfa	1,05	± 0,24	0,78	± 0,18
Lotus	0,97	± 0,24	0,54	± 0,18
Trébol blanco	0,92	± 0,20	0,61	± 0,22
Trébol rojo	0,93	± 0,21	0,66	± 0,19
Total	0,93	± 0,22	0,61	± 0,21

***INN leg:** índice de nutrición nitrogenada leguminosa. **INN aco:** índice de nutrición nitrogenada especie acompañante. **SD:** Desvío estándar.

A niveles de %Ndfa menores a 40% todas las especies presentaron INN por arriba a 0,8, y cuando superó el 40% varió entre 0,34 y 1,72 (Figura 14). De igual manera, en niveles menores a 10 kg N fijados/t MS todas las especies presentaron INN igual o mayor a 0,8, y cuando superó este valor se registraron las mayores variaciones, entre 0,34 y 1,72 (Figura 15).

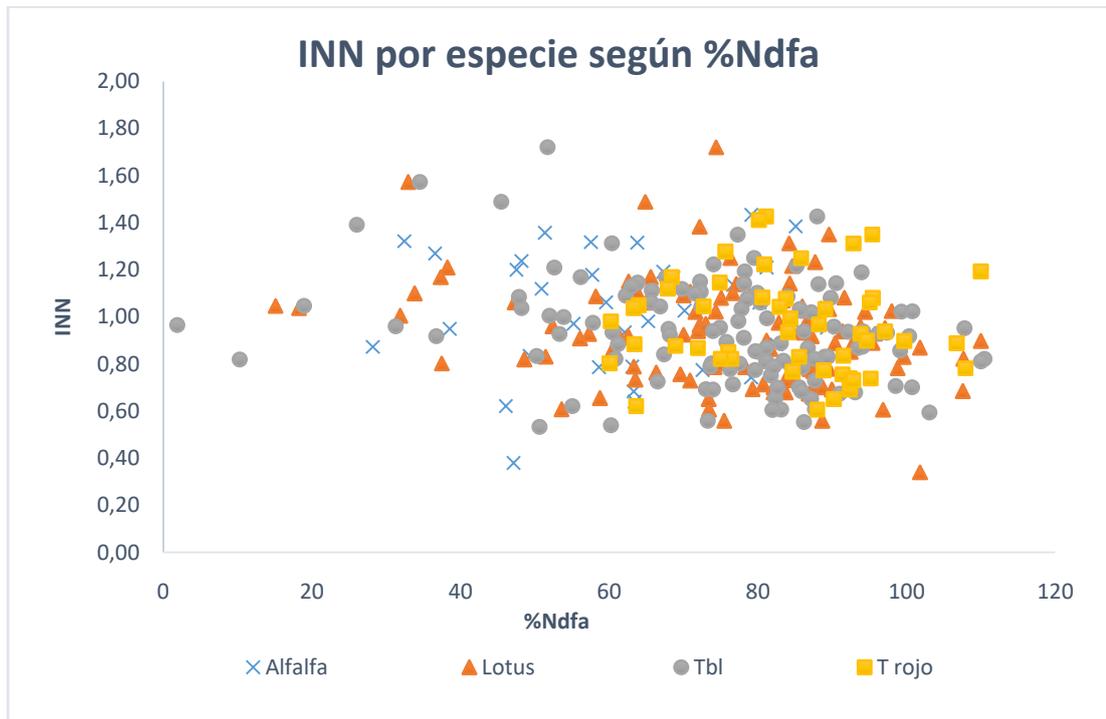


Figura 14. Índice de nutrición nitrogenada por especie según porcentaje de N derivado del aire.

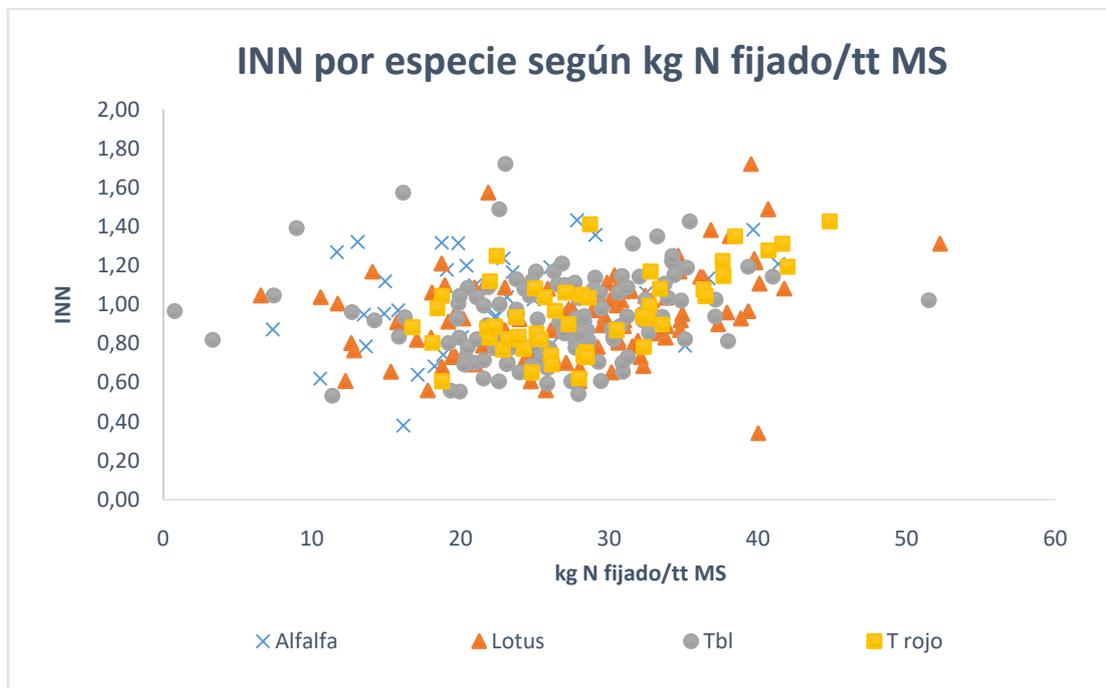


Figura 15. Índice de nutrición nitrogenada por especie según kilogramos de N por tonelada de materia seca.

El promedio general de INN para todas las especies no leguminosas acompañantes fue de 0,61, registrándose un máximo de 1,43 y un mínimo de 0,21. En promedio las

especies acompañantes están un 37% por debajo al promedio de leguminosas en términos de nutrición nitrogenada. El INN mínimo y máximo para las especies no leguminosas acompañantes de alfalfa, lotus, trébol blanco y rojo, fue de 0,43-1,26, 0,23-1,05, 0,25-1,43 y 0,21-1,05 respectivamente.

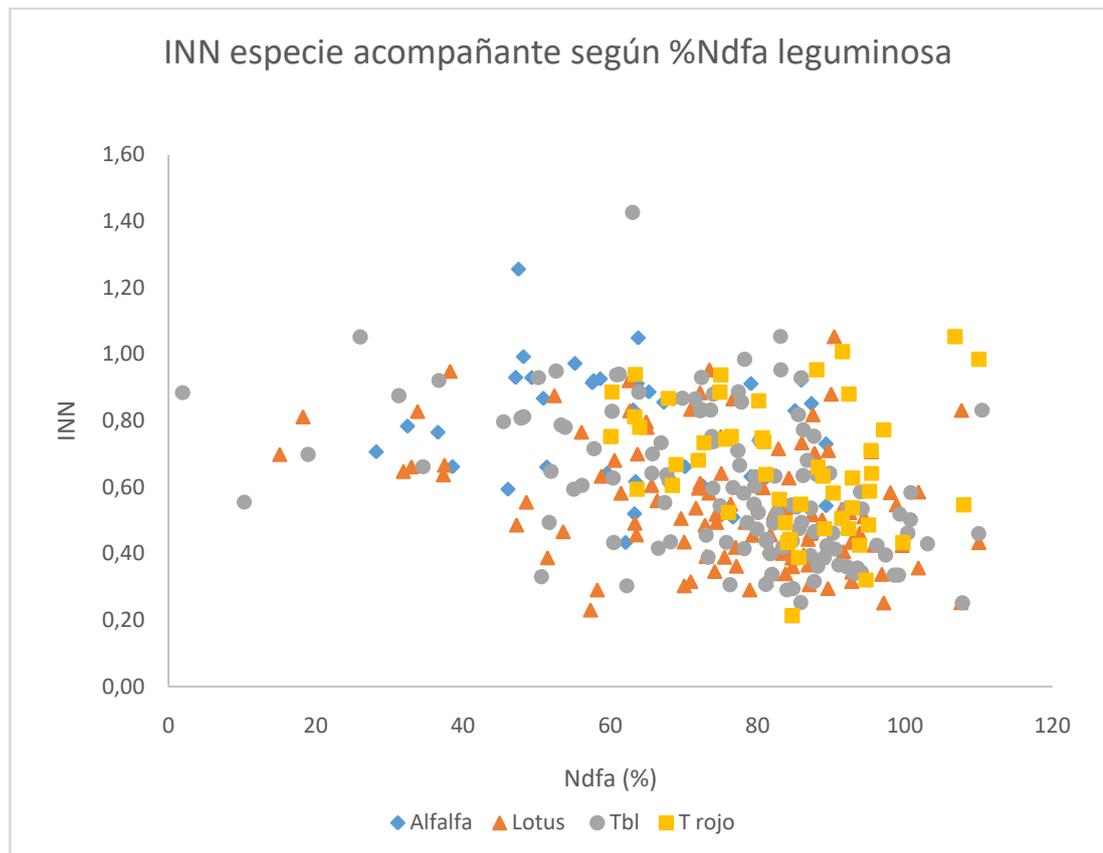


Figura 16. Índice de nutrición nitrogenada de especies acompañantes según %Ndfa de las distintas leguminosas.

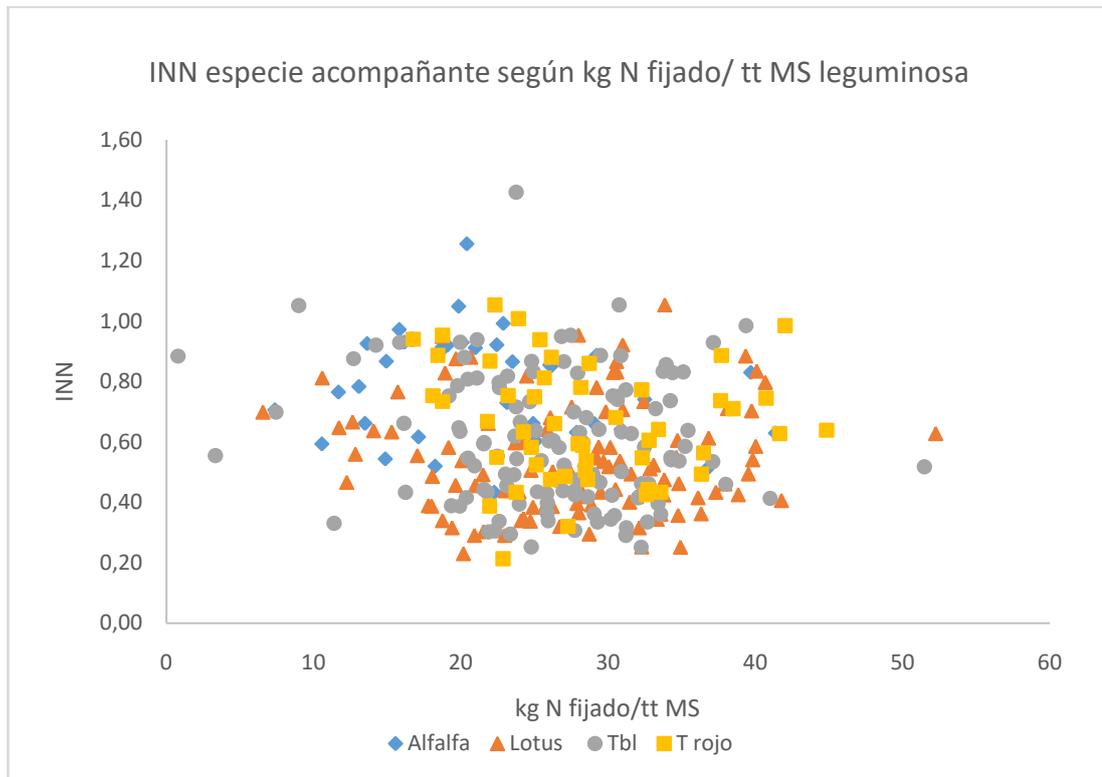


Figura 17. Índice de nutrición nitrogenada de especies acompañantes según kg N fijado por tonelada de materia seca de las distintas leguminosas.

4. DISCUSIÓN

4.1 VALORES GLOBALES DE %Ndfa y kg N fijados/t MS

Este estudio, que abarca una extensión geográfica importante, permitió cuantificar por primera vez la variabilidad existente en la FBN para las cuatro principales leguminosas forrajeras utilizadas en el Uruguay. Para la variable %Ndfa se encontraron variaciones a nivel de predio comercial de diferente magnitud según la especie, siendo aproximadamente entre 60 y 100% para trébol rojo, entre 30 y 100% para lotus y trébol blanco, y entre 25 y 90% para alfalfa. Estos datos suman a la realmente escasa información regional sobre la FBN en pasturas sembradas en predios comerciales.

En parcelas experimentales, Mallarino *et al.* (1990a) reportaron valores promedios de %Ndfa de 82 y 95% en invierno y primavera respectivamente para ensayos en la EEMAC (Paysandú), sin encontrar diferencias claras entre especies en esas estaciones de crecimiento. Asimismo, García *et al.* (1994) reportan en series técnicas del INIA valores de %Ndfa cercanos al 90% en invierno y primavera para alfalfa, lotus, trébol blanco y trébol rojo en experimentos parcelarios en INIA Estanzuela (Colonia). Esta menor variación y mayor valor promedio de %Ndfa entre experimentos parcelarios (donde el corte se realizó mecánicamente) y los valores promedios de %Ndfa del presente estudio (que provienen de un gran número de pasturas con manejos heterogéneos y donde la cosecha es animal) son esperables por el efecto del N en la excreta de los animales que es devuelto al sistema. Este último punto es tratado con mayor profundidad más adelante en la discusión.

En los únicos otros tres trabajos donde se realizaron censos con una escala similar al presente estudio, se encontraron amplias variaciones en el %Ndfa semejantes o incluso mayores a las reportadas en este estudio. Racca y González (2007) reportaron en series técnicas del INTA valores de %Ndfa que varían entre 29 y 79%, con una media de 53% para alfalfas puras durante 4 años en 5 localidades de la región pampeana en Argentina. Esta zona tiene suelos similares a los del suroeste de Uruguay, donde se concentró la mayoría de los muestreos de alfalfa realizados en el

presente estudio, y si bien los mismos estaban en mezcla con gramíneas, en el 75% de las muestras tomadas la proporción de leguminosas superaba el 80% (ver anexo figura A7). Riffkin *et al.* (1999) reportaron en el sur de Australia variaciones de 0 a 100% y de 0 a 95% para trébol blanco en suelos de textura liviana y media respectivamente, con medias de 67 y 60% en ese mismo orden. En tanto, Peoples *et al.* (1998) reportaron también en Australia un promedio de 67% en el %Ndfa para alfalfa, donde más del 60% de las muestras presentaron un %Ndfa superior a 65%. En general, la variabilidad encontrada en el presente estudio fue similar o incluso menor que lo reportado por la bibliografía internacional.

Para la variable kg de N fijado/t MS existió también variabilidad aunque con menor diferencia entre las especies, siendo la alfalfa la especie con menor promedio (22 kg N fijado /t MS) y el trébol rojo la especie con el mayor valor (28 kg N fijado/t MS). A nivel nacional es realmente escasa, prácticamente inexistente, la literatura que cuantifica esta variable para leguminosas forrajeras en pasturas sembradas comerciales que abarquen una extensa zona geográfica del Uruguay. García *et al.* (1994) reportaron en una serie técnica del INIA a nivel de parcelas experimentales valores promedios de 32, 27, 31 y 35 kg N fijado/ t MS para alfalfa, lotus, trébol blanco y rojo respectivamente. Debido al mayor valor promedio y menor variación en el %Ndfa en el trabajo de García *et al.* (1994) en comparación con el presente estudio, es lógico mayores valores promedio también en kg N fijado/t MS.

Por otra parte, en trabajos en Australia, similares al realizado en esta tesis, Riffkin *et al.* (1999) reportaron valores inferiores al presente estudio de 8,2 (entre 1,1 y 21,8) y 7,3 (entre 0 y 13,1) kg N fijado/t MS para trébol blanco en suelos de textura liviana y media respectivamente. Estos valores pueden atribuirse a una mayor variación y menor valor promedio del %Ndfa. A su vez, Peoples y Baldock (2001) sostienen que las leguminosas perennes en este mismo país aportan entre 20 y 25 kg de N fijado/t MS, y FAO (2018) propone valores globales de 20, 20, 31 y 26 kg de N fijado/t MS de leguminosa aérea para alfalfa, lotus, trébol blanco y rojo respectivamente. Estas últimas citas reportan valores promedio más cercanos al del presente estudio.

Cabe destacar que incluso en este estudio, el desvío estándar para todas las especies fue de 7 a 8 kg N fijado/ t MS según la leguminosa. Esta variación encontrada entre los distintos puntos de muestreos supone diferencias de entre 25 y 35% en la entrada de N por fijación biológica según la especie de leguminosa que se considere. Por lo que, esto refleja la importancia no solo de tener cuantificado el aporte de N por fijación biológica, sino entender las causas de la variación de la FBN de manera de poder estimar bajo qué condiciones o circunstancias utilizar uno u otro valor de referencia.

Por un lado, esta variabilidad indica que hay factores que están controlando el funcionamiento de la simbiosis y que podrían tener consecuencias para el estado nutricional de las pasturas. Ambos aspectos son discutidos en la próxima sección. Por otro lado, esta variabilidad introduce incertidumbre a la hora de cuantificar la entrada de N a los sistemas cuando se realizan balances de N. De todas formas, la FBN representa una de las principales entradas en los sistemas de producción de Uruguay, ya que son sistemas predominantemente pastoriles y con fertilizaciones nitrogenadas magras. De manera que la utilización de uno u otro valor referencia podrían inducir a grandes sub o sobre estimaciones en la entrada de N por fijación biológica. Por ejemplo, la entrada por FBN puede variar de 220 a 320 kg N/ ha/ año entre la estimación realizada con datos de este estudio o los reportados por García *et al.* (1994) para una pastura de alfalfa que produce 10 toneladas de materia seca por año, una diferencia del 30% aproximadamente. El límite de surplus de N en países de la Unión Europea para sistemas pastoriles lecheros es de 150 kg N/ año/ ha (Nevens *et al.* 2006), por lo que un error en la estimación del parámetro de entrada de N por FBN como el presentado anteriormente puede significar estar por debajo o por arriba de este límite establecido.

Las incertidumbres en la entrada de N a los sistemas pueden ser más notorias cuando solamente se toma en cuenta el N fijado en la parte aérea de las leguminosas, y no se considera el N aportado por la materia seca subterránea. FAO (2018) propone factores de corrección de 1,2 a 1,7 según la especie aplicados a los valores de referencia para cuantificar el aporte de N total de la planta entera. En el presente

estudio, con cortes a ras del suelo, considerando los valores propuestos por FAO (2018) el aporte de N en las raíces podría equivaler a un 10-15% del N aportado por la parte aérea. De manera que los valores de N fijado al considerarse la planta entera serían aproximadamente de 25, 30, 29 y 31 kg N/ t MS producida para alfalfa, lotus, trébol blanco y rojo respectivamente.

4.2 POSIBLES CAUSAS DE VARIACIÓN DE %Ndfa

Las variables % leguminosa, PMN y %N en planta fueron los factores más consistentes en explicar la variabilidad encontrada en %Ndfa desde el modelo básico hasta el completo. Con variables se encontraron únicamente relaciones lineales con el %Ndfa para todas las especies estudiadas. Por otro lado, la relación N/P en planta y el pH del suelo presentaron en general una relación no lineal con %Ndfa, pero que se hizo inconsistente a medida que se pasa desde el modelo básico al completo. En todos los casos, las interacciones pH-PMN y %leguminosa-PMN resultaron no significativas para todas las especies, y la interacción %N-%leguminosa fue significativa únicamente para alfalfa.

En las cuatro leguminosas estudiadas, las tres variables más importantes en explicar la variabilidad están asociadas, por un lado a la disponibilidad de N que hay en el suelo (% leguminosas y PMN), y por el otro a la concentración de N en planta (%N). En trébol blanco y alfalfa además se suma la concentración de N en relación a la concentración de P en planta (N/P). Esto sugiere que las leguminosas de alguna manera son capaces de censar la oferta de N en suelo en el corto-mediano plazo (Peoples y Craswell, 1992), y la demanda de N por parte de la planta (Vitousek *et al.*, 2002) y mediante estos dos mecanismos regular la proporción de N que fijan. El ambiente químico del suelo entendido como pH y disponibilidad de nutrientes (P, K, bases) tuvo un rol menos claro y definido en explicar la variabilidad en %Ndfa. Tampoco se encontró incidencia de la ecorregión sobre la variación de N fijado para ninguna de las leguminosas.

Es ampliamente reportado en la bibliografía que el N mineral disponible para la leguminosa es uno de los principales factores en determinar el %Ndfa (Ledgard y Steele 1992; Sadowsky 2005; Unkovich 2012). Dicha oferta de N va a estar sujeta no solo a la cantidad del mismo en suelo, sino cuanto está accesible para la leguminosa. Esto último está en gran medida determinado por la proporción de leguminosas en la mezcla. El agregado de una gramínea en una pastura mezcla potencia la FBN (Hardarson *et al.* 1988; Fitton *et al.* 2019), ya que las mismas son mejores competidoras que las leguminosas por el N mineral (Butler y Ladd 1985). Mallarino y Wedin (1990) sostienen que el efecto que puede tener la proporción de leguminosa en %Ndfa puede ser cuantitativamente diferente dependiendo de la especie de leguminosa. Sin embargo esto ha sido muy poco explorado en la literatura. En el presente estudio, el % leguminosa fue significativo para la regresión del modelo básico en las cuatro especies estudiadas, aunque con distinta magnitud, siendo el trébol blanco la especie con aparentemente menor sensibilidad. Esta variable se mantiene consistentemente como factor explicativo incluso en el modelo completo, y siempre el trébol blanco con aparente menor sensibilidad en términos de disminución de %Ndfa por unidad en el cambio de % leguminosa en la mezcla en comparación con lotus.

Por otro lado, tanto los kg de N aplicados en forma de fertilizante como el PMN son indicadores directos de la cantidad de N mineral disponible en suelo en el corto-mediano plazo. Mallarino *et al.* (1990a) reportaron menores niveles de %Ndfa en verano para diferentes leguminosas, y lo atribuyeron a una mayor oferta de N mineral en suelo producto de la mayor temperatura y mineralización de la materia orgánica en esa estación de crecimiento. Ante la disponibilidad de N la leguminosa inhibe la FBN ya que es un proceso de alto costo energético para la planta (Sprent y Raven, 1985). En el presente estudio, la variable PMN presentó un efecto negativo sobre %Ndfa para todas las especies de leguminosa, lo que coincide con lo ampliamente reportado en la bibliografía y confirma que la disponibilidad de N es un factor clave en regular el %Ndfa. Si bien la fertilización nitrogenada en cada pastura fue un dato relevado, no fue posible utilizarlo por incertidumbre en el dato reportado por el productor.

El efecto que la demanda y concentración de N de las plantas tienen sobre la regulación del %Ndfa es un aspecto poco explorado en la literatura. En el presente estudio, todas las leguminosas presentaron una respuesta de sentido inverso entre %N en planta y %Ndfa, siendo de mayor magnitud para trébol blanco que para lotus y trébol rojo. A su vez, en alfalfa y trébol blanco la relación N/P en planta y %Ndfa tuvo una respuesta no lineal en la cual, cuando existió una relación N/P alta (entorno 20), disminuyó el %Ndfa. Asimismo, cuando las relaciones N/P fueron más bajas (entorno 16) aumentó el %Ndfa. Para estas especies parecería existir una autorregulación de la planta basado en la oferta y demanda de N según la concentración de P. Esto concuerda con lo reportado por Güsewell (2004) que sostiene que es altamente probable que exista respuesta en producción de biomasa a la fertilización nitrogenada cuando la relación N/P en planta es menor a 10, y que exista respuesta a la fertilización fosfatada cuando esa ratio es mayor a 20. Por lo que, en las cuatro leguminosas opera un mecanismo por el cual la concentración de N en planta o la misma con respecto a otro nutriente regula en mayor o menor medida el %Ndfa.

En la revisión sobre FBN de FAO (2018) se sostiene que son esperables fijaciones de N del orden de 90% para leguminosas con cosecha mecánica, y entorno al 75-80% para leguminosas en pasturas bajo pastoreo. Análogamente en Uruguay Mallarino *et al.* (1990a) reporta valores de %Ndfa de 82 a 95% para leguminosas en parcelas experimentales, y el presente trabajo valores promedios de 63 a 84% para leguminosas bajo pastoreo. Estas diferencias podrían deberse al N excretado por los animales y a los dos mecanismos involucrados en regular la FBN descriptos anteriormente en el presente trabajo. El N excretado aumenta el N disponible en suelo y la concentración del mismo en las leguminosas, por lo que a mayor oferta de N sin costo energético las leguminosas utilizan menos N atmosférico. Por otro lado, Tonn *et al.* (2019) reportaron que el efecto de la orina en el corto plazo (17 días) fue empobrecer el enriquecimiento del $\delta^{15}\text{N}$ de las gramíneas, y en el largo plazo (30 días) enriquecer el $\delta^{15}\text{N}$ de las leguminosas, dos efectos que tendrían un impacto en la estimación del %Ndfa por medio del método de abundancia del ^{15}N hacia la baja. Si consideramos que en sistemas pastoriles templados hasta aproximadamente un

25% del área de pastoreo por año es afectado por la orina (Moir *et al.* 2011), sería esperable encontrar menores %Ndfa promedio en pasturas con leguminosas pastoreadas que en leguminosas de cosecha mecánica.

El ambiente químico del suelo es ampliamente reportado en la bibliografía como un factor con un efecto importante sobre la FBN (Ledgard y Steele 1992; Sadowsky 2005; Unkovich 2012). Sin embargo, en el presente estudio se demuestra que en Uruguay el ambiente químico es un factor de poco impacto en explicar la variación en la FBN.

En general, pH ácidos afectan la simbiosis, afectando la sobrevivencia del rizobio y el proceso de infección entre la bacteria y la planta (Cooper y Scherer 2012). A su vez, pH menores a 5,5 afectan la disponibilidad de nutrientes, incluyendo el P en suelo, y permite mayor disponibilidad de metales pesados como aluminio (Sanz-Saez *et al.* 2017). El trébol blanco requiere de suelos con pH mayores a 5,5 para un buen crecimiento (Davies 1992), y está reportado que las leguminosas son más sensibles a pH ácidos que otras gramíneas (Caradus 1980). Hackney *et al.* (2019) en una encuesta realizada en sistemas productivos pastoriles australianos reportan mayores scores de nodulación en *Trifolium spp.* en suelos con pH mayores a 5,55. En el presente estudio, el efecto de pH 0-15 cm de suelo fue significativo para trébol blanco en la regresión del modelo básico y modelo básico P+K, y con tendencia significativa para lotus únicamente en el primer modelo. En el modelo básico el máximo %Ndfa se logra con pH de 6,5-7,0 para trébol blanco y lotus respectivamente (Figura 10), coincidiendo con la franja de pH donde se da la mayor disponibilidad de los macronutrientes (Malavolta, 2006). Sin embargo, no fue una variable explicativa en el modelo completo para ninguna de las dos especies. Esto coincide por lo reportado en la bibliografía por Riffkin *et al.* (1999), quienes no encontraron asociación entre %Ndfa y pH o aluminio intercambiable en relevamientos de pasturas con trébol blanco en Australia.

En alfalfa el %Ndfa no estuvo afectado por el pH. A diferencia de lo que se planteó como hipótesis inicial y como se mencionó anteriormente, el efecto de pH no fue una variable de peso en explicar la variación en el %Ndfa en las leguminosas estudiadas.

La falta de respuesta al pH por parte de la alfalfa puede deberse a que el mismo no tenga efectos directos importantes sobre alfalfa posteriores al primer año de implantación donde ya ocurrió la simbiosis inicial.

En el presente estudio se encontraron pequeños niveles de acidificación en los primeros 3 centímetros de suelo, solamente cuando el pH fue mayor a 6,0 (ver figura anexos A12). Únicamente en trébol rojo el pH 0-3 tuvo un efecto negativo sobre el %Ndfa en el modelo completo, sin embargo esta misma variable no fue significativa en el modelo básico o básico P+K.

Junto al N el P ha sido descrito como uno de los macronutrientes principales que limita el crecimiento de las plantas (Sanz-Saez *et al.* 2017). Una deficiencia de P afecta directamente la FBN reduciendo el número de nódulos, el tamaño de los nódulos (Sanz-Saez *et al.* 2017) y en casos severos inhibe la nodulación (Almeida *et al.* 2000); e indirectamente afectando el crecimiento y fotosíntesis de la planta (Cooper y Scherer 2012). La disponibilidad de K en suelo afecta directamente la FBN, por su efecto en la formación, crecimiento y actividad del nódulo (Duke *et al.* 1980); e indirectamente afectando el crecimiento y desarrollo de la leguminosa (Premaratne y Oertli 1994). Divito y Sadras (2014) sostienen que deficiencias de P y K afectan en mayor medida el número y crecimiento de los nódulos que el crecimiento aéreo de la leguminosa. Por lo mencionado en el modelo básico P+K se incluyó el índice de P y K. En el modelo básico P+K, el índice P fue significativo para lotus y trébol rojo con un efecto negativo sobre %Ndfa, mientras que en alfalfa presentó un efecto positivo sobre %Ndfa. En cambio, el índice de K fue significativo para alfalfa y lotus, pero no para trébol blanco para el que se observó una tendencia estadística. Únicamente en lotus el K tuvo un efecto positivo sobre %Ndfa. En general, estos nutrientes lograron explicar como máximo el 8% de la variabilidad encontrada en %Ndfa, con la excepción de alfalfa. En alfalfa tanto en el modelo básico P+K como el modelo completo se duplican sus R^2 . Esto podría indicar efectos verdaderos de estas variables sobre el %Ndfa en alfalfa, pero también podría ser explicado por el bajo número de muestras combinado con alta variabilidad, por lo que cada variable que se suma al modelo incrementa mucho el R^2 .

Una posible explicación por la cual estos nutrientes tienen poco peso explicativo en el modelo es que en el presente estudio tanto los niveles de P como de K disponible en suelo, fueron frecuentemente no deficientes para el desarrollo y crecimiento de estas leguminosas. El 65% de los muestreos realizados tenían un índice de P igual o mayor a 1, es decir con niveles de P en suelo superiores a los niveles críticos reportados para esas especies, lo que fue inesperado ya que se ha reportado que los suelos en Uruguay son en su mayoría naturalmente deficientes en P (Carámbula 2002). Asimismo, el índice K con niveles críticos exigentes (0,40 meq/100g) fue igual o mayor a 1 en 40% de los casos, e igual o mayor a 0,8 en el 60%. A su vez, con niveles críticos menos exigentes (0,34 meq/100g), el índice K fue igual o mayor a 1 en 54% de los casos aproximadamente, e igual o mayor a 0,8 en el 71%. Somado *et al.* (2006) reportaron que el agregado de P como fertilizante afectó en mayor medida la cantidad de N absorbido por las leguminosas que el %Ndfa en sí mismo. Sin embargo, Riffkin *et al.* (1999) reportaron una relación directa entre el nivel de P y K disponible en suelo con el %Ndfa en suelos de textura media y textura liviana. En ese estudio los niveles de K disponible en suelo también fueron raramente deficientes para este nutriente. Además Hackney *et al.* (2019) reportaron mayores scores de nodulación en pasturas con *Trifolium spp.* cuando el ratio P disponible : P crítico superó 0,67.

Cabe destacar que en la regresión del modelo básico P+K, el índice de P y K tienen en todos los casos signos opuestos, lo que podría indicar un antagonismo entre estos nutrientes. James *et al.* (1995) reportaron que la fertilización con P en alfalfa afecta indirectamente la concentración de K en planta, ya que el agregado de P tiene efecto positivo sobre la concentración de Na, Ca y Mg en planta, de manera que se incrementa el antagonismo mutuo existente entre estos cuatro cationes. A su vez, en el estudio realizado por Riffkin *et al.* (1999) se reporta algo similar para el N fijado en suelos de textura media, donde la concentración de P y K disponible en suelo tienen efectos de sentido opuesto sobre N fijado por tonelada materia seca aérea en trébol blanco.

Para contemplar la heterogeneidad espacial existente se utilizaron regresiones geográficamente ponderadas (GWR). Estos modelos no lograron coeficientes de determinación superiores a las regresiones múltiples, evidenciando poca heterogeneidad espacial para %Ndfa. Además no hubo autocorrelación para la variable %Ndfa, de manera que se distribuye de manera aleatoria entre las entidades del área de estudio.

Considerando los promedios simples del muestreo realizado, alfalfa fue la especie con menor %Ndfa (63%), seguido por lotus y trébol blanco (76 y 75% respectivamente), y finalmente trébol rojo (84%). Las cuatro especies muestreadas presentaron un mismo rango amplio en las condiciones de suelo y de manejo (ver anexo figuras A5-A11) para las variables utilizadas en el modelo básico y básico P+K. La mayor diferencia fue el % leguminosa en alfalfa, ya que la mayoría de los muestreos realizados tenían una alta proporción de esta leguminosa en la mezcla (70 a 100%), y un promedio de 80% en comparación con el resto que tuvieron un promedio de 50%. En parte, el menor %Ndfa promedio encontrado en alfalfa en comparación con el resto de las especies, se explica por dicha diferencia en el %leguminosa, ya que a mayor %leguminosa menor %Ndfa. Sin embargo, parte de la diferencia no es explicada por % leguminosas, ya que alfalfa sigue teniendo valores menores de %Ndfa incluso cuando se utilizan los modelos básicos ajustados de cada una de las cuatro especies pero con el valor de la mediana de los sitios donde se muestreo alfalfa en las variables que lo integran, de manera de simular mismas condiciones de suelo y manejo en todas las leguminosas (ver anexo figura A13-A17).

Por otro lado, el mayor %Ndfa promedio encontrado en trébol rojo se debe principalmente a una menor sensibilidad de dicha especie al PMN, %N y a la fertilización nitrogenada en comparación con el resto de las especies. En el modelo básico y básico P+K si bien el sentido del efecto de las variables %N y PMN fue igual en las cuatro especies leguminosas, la magnitud de dicho efecto difirió sensiblemente. Lotus presentó las mayores disminuciones en el %Ndfa por unidad de incremento de PMN, seguido de trébol blanco y alfalfa, y en menor medida lo hizo trébol rojo (Figura 7). La idea anterior se evidencia claramente cuando lotus o trébol

blanco se encuentran en mezclas con trébol rojo, y por lo tanto están en un suelo con un mismo PMN, esta última especie logra mantener igual o mayores %Ndfa en el 85 y 78% de los casos muestreados respectivamente (Figura 13 C-D). Además cuando recibió urea fue la única especie que no vio afectado el %Ndfa (Cuadro 6). Cuando se aplicó urea, alfalfa, lotus y trébol blanco se enriquecieron en ^{15}N probablemente por mayor acceso al N mineral del suelo, mientras que el trébol rojo se mantuvo igual, confirmando menor sensibilidad al N aplicado que el resto de las especies. Esto coincide parcialmente por lo reportado por Mallarino y Wedin (1990) donde el lotus fue la especie más sensible a fertilizaciones nitrogenadas.

Los dos principales mecanismos que regulan el %Ndfa reportados en el presente trabajo (demanda de N y oferta de N mineral para la leguminosa) y sintetizados en el modelo básico lograron explicar como máximo el 40% de la variabilidad en esa variable. Aún con este R^2 moderado, el ajuste entre valores observados y valores predichos (Figura 11 y 12) por estos modelos resultó en errores medios absolutos de 11 y 10% para el modelo básico y modelo básico P+K respectivamente.

En parte, la discrepancia puede deberse al error intrínseco del método de abundancia natural ^{15}N . La propagación de errores en las variables utilizadas en la estimación del %Ndfa (B, $\delta^{15}\text{N}$ referencia, $\delta^{15}\text{N}$ leguminosa) indica que el error en la determinación de $\delta^{15}\text{N}$ puede explicar variaciones de aproximadamente 5 puntos porcentuales del %Ndfa (cerca de la mitad del error medio absoluto de los modelos propuestos). Esto refuerza la idea que la demanda y oferta de N son centrales para explicar la variación en %Ndfa para las leguminosas en Uruguay, y que los mecanismos asociados al ambiente químico y ecorregión son menos importantes.

Las diferencias entre observados y predichos es mayor a 30%, y siempre negativa en el 7 y 8% de los casos muestreados en lotus y trébol blanco respectivamente. En estos casos los mecanismos postulados no explican la variación en el %Ndfa observado, sino que otros factores estarían actuando. En el cuadro 6 se observa como aumenta para lotus y trébol blanco el error medio absoluto del modelo cuando se compara los casos de pasturas con y sin aplicaciones de urea. En estas dos especies la fertilización nitrogenada parece explicar parte de la variabilidad encontrada en

%Ndfa, aunque en este estudio no se pudo evaluar esta variable como factor explicativo por incertidumbre en el dato recabado.

Los factores utilizados en la regresión del modelo básico lograron explicar de un 23 a un 44% de la variabilidad encontrada en el %Ndfa, del modelo básico P+K explicaron de un 35 a un 50%, y con el modelo completo se lograron máximos de 22 a 85%. Si bien el modelo completo fue capaz de explicar una mayor parte de la variabilidad que el modelo básico y básico P+K, no se encontraron patrones de efectos contundentes y con sentido biológico, ni se puede asegurar que exista una relación causa-efecto entre la variable dependiente y las independientes. En resumen, los dos mecanismos que engloba el modelo básico explican la mayor parte de la variabilidad encontrada en %Ndfa para las cuatro leguminosas estudiadas.

4.3 CONSECUENCIAS DE LA VARIABILIDAD EN LA FBN

El INN promedio de las leguminosas en Uruguay es cercano a uno, siendo de 0,92 a 1,02 según la especie, por lo que evidencia que en general las mismas no están limitadas por N. No existe una asociación clara entre el INN y el %Ndfa, produciéndose una amplia variación en el INN en todos los rangos de %Ndfa. Esto es lógico cuando se piensa en los dos mecanismos que regulan la variación de %Ndfa, no solamente depende de la concentración de N en planta, sino de la cantidad de N mineral al cual la leguminosa pueda acceder.

A su vez, en general todas las especies acompañantes no-leguminosas en la mezcla están limitadas por N, por lo que parece existir en la mayoría de los casos una escasa o insuficiente transferencia directa de N en el corto plazo desde las leguminosas a estas especies.

5. CONCLUSIONES

- La información recabada en este estudio muestra que la variabilidad en la fijación de N de las cuatro leguminosas forrajeras más utilizadas en pasturas sembradas en nuestro país es mayor al reportado en la bibliografía nacional a nivel de parcelas experimentales, pero menor que lo reportado por trabajos de características similares realizados en pasturas de alfalfa en Argentina y en pasturas con trébol blanco en Australia.
- En las cuatro especies la variabilidad encontrada responde principalmente a dos mecanismos, asociados a la disponibilidad de N del suelo (PMN, %leguminosa) y a la concentración de N en planta (%N, N/P), donde altos niveles de N en planta o disponibles en el suelo provocan menor utilización de N atmosférico por parte de la planta. De todas formas, los mecanismos mencionados explican como máximo un 40% de la variabilidad en el %Ndfa, generando un modelo predictivo con un error absoluto medio de 11%.
- Ni las propiedades químicas de suelo ni la zona agroecológica afecta mayormente de forma directa la fijación de N de ninguna de las especies.
- Trébol rojo fue la especie que mostró menor sensibilidad en su %Ndfa a cambios en la disponibilidad de N, y por ende la especie con mayor valor promedio de %Ndfa.
- Alfalfa fue la especie con menor valor promedio de %Ndfa, sin poder afirmar que se debe únicamente a diferencias en las condiciones de muestreo.
- Ni el índice de nutrición nitrogenada de las leguminosas, ni el de las especies no-leguminosas acompañantes, están relacionados al nivel de FBN.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ali Z, Khan H, Azam S, Ahmad I. 2010. Evaluation of Leguminous Forage Crops for Nodulation, Nitrogen Fixation and Quality Yield. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environmental Sciences*, 9 (3): 269-272.
- Almeida PF, Hartwig UA, Frehner M, No J, Lu A. 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51: 1289-1297. doi: 10.1093/jexbot/51.348.1289
- Altier N, Beyhaut E, Pérez C. 2013. Root nodule and rhizosphere bacteria for forage legume growth promotion and disease management. En: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A. (Eds.). *Bacteria in Agrobiolology: Crop Productivity*. Berlin: Springer. 167-184.
- Altier N. 2010. Enfermedades en pasturas. En: Altier N, Rebuffo M, Cabrera K. (Eds.). *Enfermedades y plagas en pasturas*. Montevideo: INIA (INIA Serie Técnica) 183: 19-35.
- Alves JB, Saccol de Sá EL, Muniz AW. 2012. Selección de rizobios para *Trifolium repens* en condiciones de suelo inundado. *Biotemas*, 25 (1): 39-45.
- Anthraper A, DuBois JD. 2003. The effect of NaCl on growth, N₂ fixation (acetylene reduction), and percentage total nitrogen in *Leucaena leucocephala* (Leguminosae) var. K-8. *American Journal of Botany*, 90: 638-692.
- Baraibar A, Frioni L, Guedes ME, Ljunggren H. 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34:1011–1017.
- Batista L, Irisarri P, Rebuffo M, Cuitiño MJ, Sanjuán J, Monza J. 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial

inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*, 51: 11–20.

Bonetti R, Montanheiro M, Saito S. 1984. The effects of phosphate and soil moisture on the nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris*. *The Journal of Agricultural Science*, 103(1): 95-102. doi:10.1017/S0021859600043367.

Brockwell J, Pilka A, Holliday RA. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 31: 211–219. doi:10.1071/EA9910211

Brown RH. 1985. Growth of C₃ and C₄ grasses under low N levels. *Crop Science*, 25:954-957.

Büchi L, Gebhard CA, Liebisch F, Sinaj S, Ramseier H, Charles R. 2015. Accumulation of biologically fixed nitrogen by legumes cultivated as cover crops in Switzerland. *Plant and Soil*, 393:1-13.

Butler JHA, Ladd JNL. 1985. Growth and nitrogen fixation by *Medicago littoralis* in pot experiments: effect of plant density and competition from *Lolium multiflorum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 355-361. doi:10.1016/0038-0717(85)90073-2.

Caradus JR. 1980. Distinguishing between grass and legume species for efficiency of phosphorus use. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 23: 75-81. doi: 10.1080/00288233.1980.10417847

Carámbula M. 2002. Potenciales y alternativas para producir forraje. En: Carámbula M. (Ed.). *Pasturas y forrajes: potenciales y alternativas para producir forraje*. Montevideo: Hemisferio Sur. 1-39.

Cardozo GA. 2019. Causas y consecuencias de la entrada de nitrógeno por fijación biológica en campo natural. Tesis Maestría en Ciencias agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 123 p.

- Carlsson G, Huss-Danell K. 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil*, 253: 353–372.
- Carranca C, de Varennes A, Rolston D. 1999. Biological nitrogen fixation by fababean, pea and chickpea, under field conditions, estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. *European Journal of Agronomy*, 10: 49–56.
- Castro-Sowinski S, Carrera I, Catalan AI, Coll J, Martinez-Drets G. 2002. Occurrence, diversity and effectiveness of mid-acid tolerant alfalfa nodulating rhizobia in Uruguay. *Symbiosis*, 32: 105–118.
- Catroux G, Hartmann A, Revellin C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230: 21–30.
- Collino DJ, Salvagiotti F, Peticari A, Piccinetti C, Ovando G, Urquiaga S, Racca RW. 2015. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil and meteorological factors. *Plant and Soil*, 392: 239-252.
- Cooper JE, Scherer HW. 2012. Nitrogen fixation. En: Marschner P. (Ed.). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Londres: Elsevier. 389-408. doi:10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9.
- Cooper JE, Wood M, Holding AJ. 1983. The influence of soil acidity factors on rhizobia. En: Jones DG, Davies DR (Eds.). *Temperate Legumes. Physiology, Genetics and Nodulation*. London: Pittman. 319-335.
- Dart PJ, Day JM. 1971. Effects of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. *Plant and Soil*, 35: 167-184. doi:10.1007/BF02661849.
- Davies A. 1992. White clover. *Biologist*, 31: 129-133.
- Diaz Lago GE, García JA, Rebuffo M. 1996. Crecimiento de leguminosas en La Estanzuela. En: Díaz G, García JA, Rebuffo M. (Eds.). *Crecimiento de leguminosas en La Estanzuela*. Montevideo: INIA (INIA Serie Técnica) 71: 1-18.

- diCenzo GC, Zamani M, Checcucci A, Fondi M, Griffiths JS, Finan TM, Mengoni A. 2018. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Canadian Journal of Microbiology*, 65: 1-33.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2017. Producción [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario 2017. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 27 noviembre 2019. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estad%C3%ADstico-de-diea-2017>
- Divito GA, Sadras VO. 2014. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crops Research*, 156: 161-171. doi: 10.1016/j.fcr.2013.11.004.
- Duke SH, Collins M, Soberalske RM. 1980. Effects of potassium fertilization on nitrogen fixation and nodule enzymes of nitrogen metabolism in alfalfa. *Crop Science*, 20: 213-219.
- FAO. 2018. Biological nitrogen fixation. En: FAO (Ed.). *Nutrient flows and associated environmental impacts in livestock supply chains: Guidelines for assessment (Version 1)*. Rome: FAO. 83-85.
- Field C, Mooney HA. 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. En: Givnish TJ. (Ed.). *On the economy of plant form and function*. Cambridge: Cambridge University Press. 2555.
- Fitton N, Bindi M, Brillì L, Cichota R, Dibari C, Fuchs K, Snow V. 2019. Modelling biological N fixation and grass-legume dynamics with process-based biogeochemical models of varying complexity. *European Journal of Agronomy*, 106: 58-66. doi: 10.1016/j.eja.2019.03.008.

- García J, Labandera C, Pastorini D, Curbelo S. 1994. Fijación de nitrógeno por leguminosas en La Estanzuela. En: Moron A, Risso D (Eds.). Nitrógeno en pasturas. Montevideo: INIA (INIA Serie Técnica) 51: 13-18.
- Graham PH, Vance CP. 2000. Nitrogen fixation in perspective, an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65: 93-106.
- Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Aarons SR, Quinto C. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for pH tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 198-207.
- Gregerson RG, Lowell Robinson D, Vance CP. 1999. Carbon and nitrogen metabolism in *Lotus*. En: Beuselinck PR. (Ed.). *Trefoil: the science and technology of Lotus*, ASA-CSSA, CSSA special publication 28.167-185.
- Güsewell S. 2004. N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist*, 164: 243-266.
- Gutiérrez P, Sanjuán J, Monza J. 2019. Selección de cepas eficientes por competitividad. En: Monza J (Ed.). *Evaluación de cepas nativas para el desarrollo de un inoculante rizobiano competitivo y eficiente en trébol blanco enfocado a suelos con poblaciones de rizobios parásitos*. Montevideo: INIA (INIA Serie Técnica) 79: 9-16.
- Hackney BF, Jenkins J, Powells J, Edwards CE, De Meyer S, Howieson JG, Yates RJ, Orgill SE. 2019. Soil acidity and nutrient deficiency cause poor legume nodulation in the permanent pasture and mixed farming zones of south-eastern Australia. *Crop and Pasture Science*, 70 (12): 1128-1140. <https://doi.org/10.1071/CP19039>
- Hardarson G, Danso SKA, Zapata F. 1988. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. *Crop Science*, 28: 101-105.

- Hatch DJ, Macduff JH. 1991. Concurrent rates of N₂ fixation, nitrate and ammonium uptake by white clover in response to growth at different root temperatures. *Annals of Botany*, 67: 265-274.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311: 1-18.
- Hofer D, Suter M, Buchmann N, Lüscher A. 2017. Nitrogen status of functionally different forage species explains resistance to severe drought and post-drought overcompensation. *Agriculture Ecosystem Environment*, 236: 312-322.
- Hubac C, Ferran J, Tremolieres A, Kondorosi A. 1994. Luteolin uptake by *Rhizobium meliloti*, Evidence for several steps, including an active extrusion process. *Microbiology*, 140: 2769-2774.
- Irisarri P, Cardozo G, Tartaglia C, Reyno R, Gutiérrez P, Lattanzi FA, Rebuffo M, Monza J. 2019. Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover. *Frontiers in Microbiology*, 10: 768. doi: 10.3389/fmicb.2019.00768.
- Jakobsen ST. 1993. Interaction between Plant Nutrients: III. Antagonism between Potassium, Magnesium and Calcium. *Soil and Plant Science*, 43: 1-5. doi:10.1080/09064719309410223.
- James DW, Hurst CJ, Tindall TA. 1995. Alfalfa cultivar response to phosphorus and potassium deficiency: Elemental composition of the herbage. *Journal of Plant Nutrition*, 18 (11): 2447-2464. doi: 10.1080/01904169509365076
- Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Nielsen HH, Alves BJR, Morisson MJ. 2012. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32: 329-364. doi: 10.1007/s13593-011-0056-7.

- Jensen ES. 1996. Nitrogen and grain legumes: advantages and problems to balance. *Grain Legumes*, 14:22.
- Johnstone GR, Barbetti MJ. 1987. Impact of fungal and virus diseases on pasture. En: Wheeler JL, Pearson CJ, Robards GE. (Eds.). *Temperate pastures: their production, use and management*. Melbourne: CSIRO Publishing. 235-248.
- Kuang RB, Liao H, Yan XL, Dong YS. 2005. Phosphorus and nitrogen interactions in field-grown soybean as related to genetic attributes of root morphological and nodular traits. *The International Journal of Plant Biology*, 47: 549-559.
- Ledgard S, Boyes M, Brentrup F. 2011. Life cycle assessment of local and imported fertilisers used on New Zealand farms. En: Currie LD, Christensen CL (Eds.). *Adding to the knowledge base for the nutrient manager*. Palmerston North: Massey University. 1-13.
- Ledgard S, Schils R, Eriksen J, Luo J. 2009. Environmental impacts of grazed clover/grass pastures. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 48: 209-226.
- Ledgard S, Penno J, Sprosen M. 1999. Nitrogen inputs and losses from clover/grass pastures grazed by dairy cows, as affected by nitrogen fertilizer application. *The Journal of Agricultural Science*, 132 (2): 215-225. doi:10.1017/S002185969800625X
- Ledgard SF, Steele KW. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil*, 141: 137-153.
- Lemaire G, Gastal F. 1997. N uptake and distribution in plant canopies. En: Lemaire G. (Ed.). *Diagnosis of the nitrogen status in crop*. Verlag; Springer. 3-43.
- Lemaire G, Chartier M. 1992. Relationships between growth dynamics and nitrogen uptake for individual sorghum plants growing at different plant

densities. En: Proceedings 2nd Congress of European Society of Agronomy. Londres. Warwick University. 98-99.

Lemaire G, Gastal F, Salette J. 1989. Analysis of the effect of N nutrition on dry matter yield of a sward by reference to potential yield and optimum N content. En: Proc XVI International Grassland Congress. Nice.179-180.

Lemaire G, Gruz P, Gosse G, Chartier M. 1985. Relationship between dynamics of nitrogen uptake and dry matter growth for lucerne (*Medicago sativa* L.). *Agronomie*, 5: 685-692.

Lemaire G, Salette J. 1984a. Relationship between growth and nitrogen uptake in a pure grass stand. I. -Environmental effects. *Agronomie*, 4: 423-430.

Lemaire G, Salette J. 1984b. Relationship between growth and nitrogen uptake in a pure grass stand. II. - Variability in different genotypes. *Agronomie*, 4: 431-436.

Liebisch F, Buenemann EK, Huguenin-Elie O, Jeangros B, Frossard E, Oberson A. 2013. Plant phosphorus nutrition indicators evaluated in agricultural grasslands managed at different intensities. *European Journal of Agronomy*, 44: 67-77.

Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research Microbiology*, 161: 453-463.

Loide V.2004. About the effect of the contents and ratios of soil's available calcium, potassium and magnesium in liming of acid soils. *Agronomy Research*, 2: 71-82.

Lowther WL, Loneragan JF. 1968. Calcium and nodulation in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*). *Plant Physiology*, 43: 1362-1366.

- Lüscher A, Mueller-Harvey I, Soussana JF, Rees RM, Peyraud JL. 2014. Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science*, 69: 206-228.
- Malavolta E. 2006. El suelo como medio para el crecimiento de las plantas. En: Malavolta E. (Ed.). *Manual de nutrición mineral de plantas*. San Pablo: Ceres. 1-34.
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. 1989. Evaluación del estado nutricional de las plantas. En: Ferreira SA. (Ed.) *Evaluación del estado nutricional de las plantas. Principios y aplicaciones*. San Pablo: Potafos. 1-129.
- Mallarino AP, Wedin WF, Perdomo CH, Goyenola RS, West CP. 1990a. Legume species and proportion effects on symbiotic dinitrogen fixation in legume-grass mixtures. *Agronomy Journal*, 82: 785-789. doi:10.2134/agronj1990.00021962008200040026x
- Mallarino AP, Wedin WF, Perdomo CH, Goyenola RS, West CP. 1990b. Nitrogen transfer from White Clover, Red Clover, and Birdsfoot Trefoil to Associated Grass. *Agronomy Journal*, 82: 790-795.
- Mallarino AP, Wedin WF. 1990. Nitrogen fertilization effects on dinitrogen fixation as influenced by legume species and proportion in legume-grass mixtures in Uruguay. *Plant and Soil*, 124: 127-135. doi: 10.1007/BF00010940.
- Mariotti A. 1983. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements. *Nature*, 303: 685-687.
- McLean EO, Carbonell MD. 1972. Calcium, Magnesium, and Potassium Saturation Ratios in Two Soils and Their Effects Upon Yields and Nutrient Contents of German Millet and Alfalfa. *Soil Science Society of America*, 36: 927-930.
- Moir JL, Cameron KC, Di HJ, Fertsak U. 2011. The spatial coverage of dairy cattle urine patches in an intensively grazed pasture system. *The Journal*

of *Agricultural Science*, 179: 473-485. <https://doi.org/10.1017/S0021859610001012>.

Montañés L, Heras L, Abadía J, Sanz M. 1993. Plant analysis interpretation based on a new index: deviation from optimum percentage. *Journal of Plant Nutrition*, 16: 1289-1308.

Morris DR, Weaver RW, Smith GR, Rouquette FM. 1990. Nitrogen transfer from arrowleaf clover to ryegrass in field plantings. *Plant and Soil*, 128: 293-297.

Nesheim L, Boller BC. 1991. Nitrogen fixation by white clover when competing with grasses at moderately low temperatures. *Plant and Soil*, 133: 47. <https://doi.org/10.1007/BF00011898>

Nevens F, Verbruggen I, Reheul D, Hofman G. 2006. Farm gate nitrogen surpluses and nitrogen use efficiency of specialized dairy farms in Flanders: evolution and future goals. *Agricultural Systems*, 88: 142-155.

Nyfeler D, Huguenin-Elie O, Suter M, Frossard E, Lüscher A. 2011. Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture Ecosystem Environment*, 140: 155-163.

O'Hara GW, Nantakorn B, Dilworth MJ. 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 108: 93-110.

Peoples MB, Chalk PM, Unkovich MJ, Boddey RM. 2015. Can differences in ¹⁵N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to non-legume plant species?. *Soil Biology Biochemistry*, 87: 97-109.

Peoples MB, Baldock JA. 2001. Nitrogen dynamics of pastures: nitrogen fixation inputs, the impact of legumes on soil nitrogen fertility, and the contributions of fixed nitrogen to Australian farming systems. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 327-346. doi:10.1071/EA99139

- Peoples MB, Gault RR, Scammell GJ, Dear BS, Virgona J, Sandral GA, Paul J, Wolfe EC, Angus JF. 1998. Effect of pasture management on the contributions of fixed nitrogen to the nitrogen economy of ley-farming systems. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49: 459-474.
- Peoples MB, Craswell ET. 1992. Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, 141: 13-39. doi: 10.1007/BF00011308.
- Premaratne JP, Oertli JJ. 1994. The influence of potassium supply on nodulation, nitrogenase activity and nitrogen accumulation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in nutrient solution. *Fertilizer Research*, 38: 95-99. doi:10.1007/BF00748769.
- Quagliotto L, Azziz G, Bajsa N, Vaz P, Pérez C, Ducamp F, Cadenazzi M, Altier N, Arias A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control*, 51: 42-50.
- Racca RW, González N. 2007. Nutrición nitrogenada de la alfalfa e impacto de la fijación biológica del nitrógeno. En: Basigalup DH. (Ed.). *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. Buenos Aires: INTA. 67-79.
- Richardson AE, Djordjevic MA, Rolfe BG, Simpson RJ. 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and soil*, 109: 37-47.
- Riffkin PA, Quigley PE. , Kearney G, Cameron FJ, Gault RR, Peoples MB, Thies JE. 1999. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 261-272.

- Rochette P, Janzen ES. 2005. Towards a Revised Coefficient for Estimating N₂O Emissions from Legumes. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 73: 171. doi:10.1007/s10705-005-0357-9.
- Sadowsky MJ. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. En: Werner D, Newton WE. (Eds.). *Nitrogen Fixation in Agriculture; Forestry, Ecology, and the Environment*. Dordrecht: Springer. 89-112.
- Sanz-Saez A, Morales F, Arrese-Igor C, Aranjuelo I. 2017. P Deficiency: A Major Limiting Factor for Rhizobial Symbiosis. En: Sulieman S, Phan Tran LS. (Eds.). *Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability*. Suiza: Springer International Publishing. 21-40. doi: 10.1007/978-3-319-55729-8.
- Scherer HW, Pacyna S, Manthey N, Schulz M. 2006. Sulphur supply to peas (*Pisum sativum L.*) influences symbiotic N₂ fixation. *Plant Soil and Environment*, 52: 72-77.
- Scherer HW, Danzeisen L. 1980. The effect of increasing nitrogen fertilizer rates on the development of root nodules, on the symbiotic N₂ assimilation, and on growth and yield of broadbeans (*Vicia faba L.*). *Pflanzen. Bodenk*, 43:464-470.
- Shearer G, Kohl DH. 1986. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural¹⁵N abundance. *Australian Journal Plant Physiology*, 13: 699-756.
- Simioni TA, Gomes FJ, Gomes UH, Fernandes GA, Botini LA, Mousquer CJ, Rodrigues de Castro WJ, Hoffmann A. 2014. Potencialidades de la mezcla de gramíneas y leguminosas forrajeras en pasturas tropicales. *PUBVET*, 13 (8):1742.
- Sinclair AG, Morrison JD, Smith C, Dodds KG. 1997. Determination of optimum nutrient element ratios in plant tissue. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 1069-1083.

- Somado EA, Sahrawat KL, Kuehne RF. 2006. Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 123-130. doi: 10.1007/s00374-006-0094-5
- Sprent JI, Raven JA. 1985. Evolution of nitrogen-fixing symbioses. *Proceedings of Royal Society of Edinburgh*, 85B: 215-237.
- Striker GG, Colmer TD. 2017. Flooding tolerance of forage legumes. *Journal of Experimental Botany*, 68 (8): 1851-1872.
- Tonn B, Porath I, Lattanzi FA, Isselstein J. 2019. Urine effects on grass and legume nitrogen isotopic composition: Pronounced short-term dynamics of $\delta^{15}\text{N}$. *PLOS ONE*, 14. doi: 10.1371/journal.pone.0210623
- Trinick MJ. 1982. Nitrogen Fixation. En: Broughton WJ (Ed.). *Biology*. Oxford: Clarendon Press. 76146.
- Ulrich A. 1952. Physiological bases for assessing the nutritional requirements of plants. *Annual Review Plant Physiology*, 3:207-228.
- Unkovich M. 2012. Nitrogen fixation in Australian dairy systems: Review and prospect. *Crop and Pasture Science*, 63: 787-804. doi: 10.1071/CP12180
- Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey R, Giller K. (Eds.) 2008. *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems*. Canberra: ACIAR (Australian Centre for International Agricultural Research), 258 p.
- Unkovich MJ, Pate JS. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N_2 fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, 65: 211-228. doi: 10.1016/S0378-4290(99)00088-X
- Unkovich MJ, Pate JS, Sanford P, Armstrong EL. 1994. Potential precision of the $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in southwest Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45: 119-132.

- van Kessel C, Hartley C. 2000. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?. *Field Crops Research*, 65: 165-181.
- Vitousek PM, Cassman KG, Cleveland C, Crews T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, Marino R, Martinelli L, Rastetter EB, Sprent JI. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57/58: 1-45.
- Xiao Y, Li L, Zang F. 2004. Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and faba bean using direct and indirect ¹⁵N techniques. *Plant and Soil*, 262: 45-54.
- Zheng M, Zhou Z, Luo Y, Zhao P, Mo J. 2019. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 25. doi: 10.1111/gcb.14705.

7. ANEXOS

7.1 FIGURAS Y CUADROS

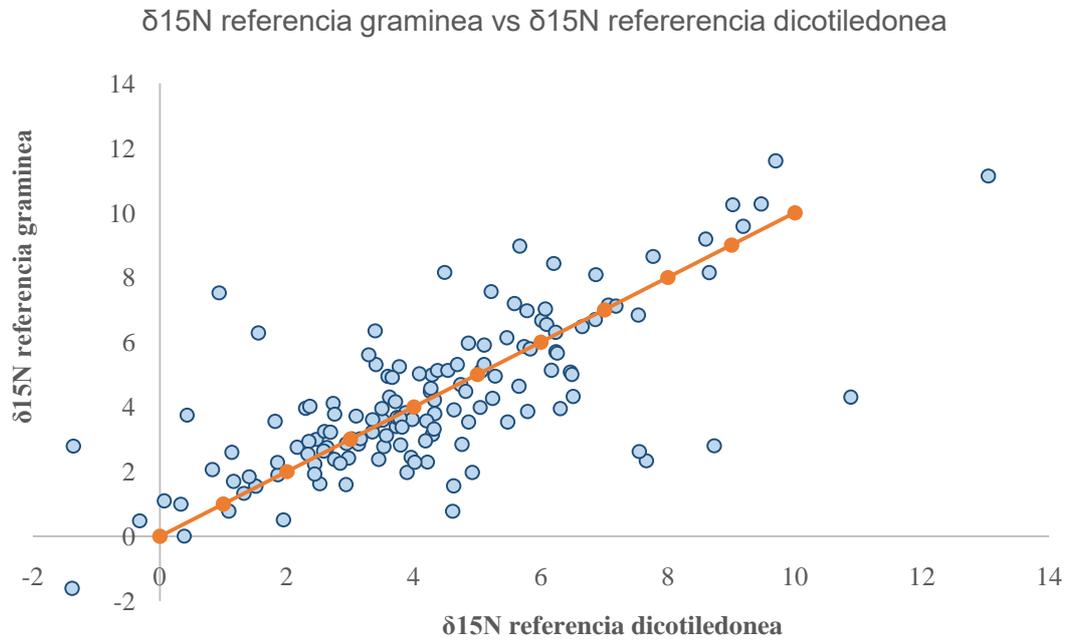


Figura A 1. Gráfico de relación entre $\delta^{15}\text{N}$ gramínea referencia y $\delta^{15}\text{N}$ dicotiledónea referencia en marco A.

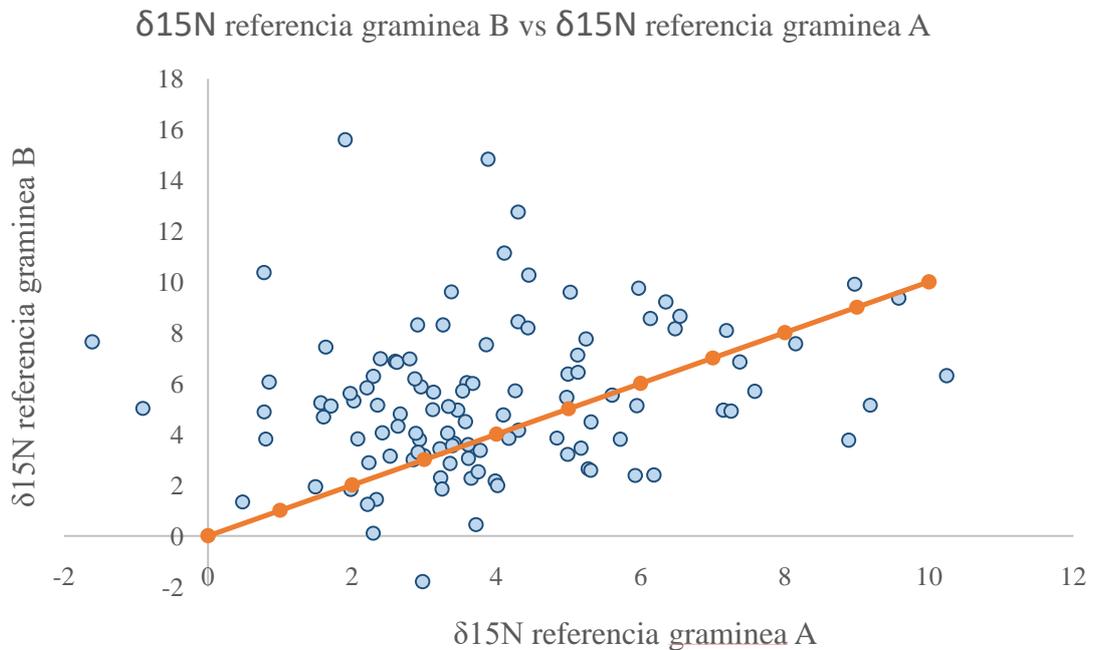


Figura A 2. Gráfico de relación entre $\delta^{15}\text{N}$ gramínea referencia marco B y $\delta^{15}\text{N}$ gramínea referencia en marco A.

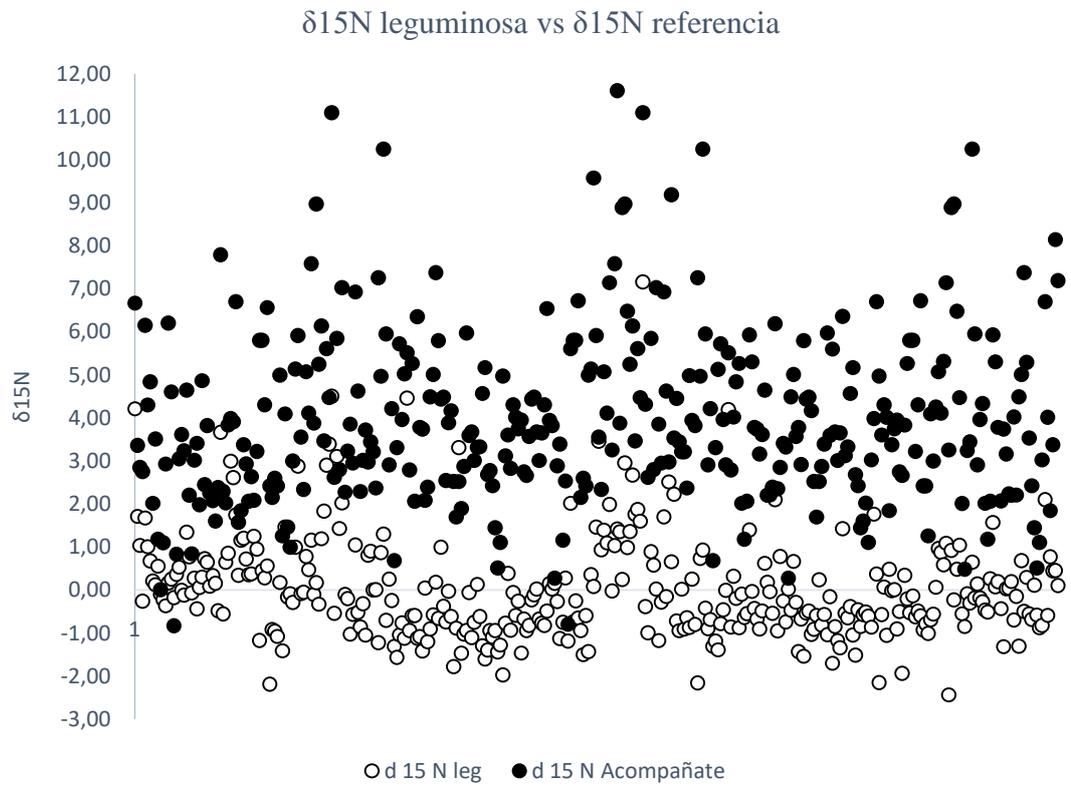


Figura A 3. $\delta^{15}\text{N}$ gramínea referencia y $\delta^{15}\text{N}$ leguminosa en 357 muestras originales.

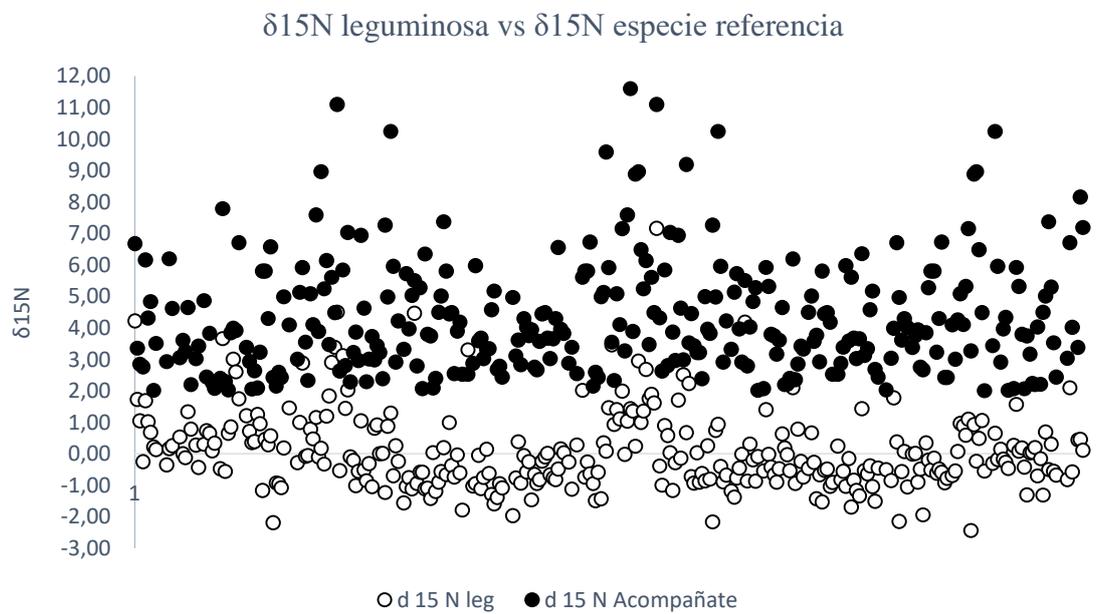


Figura A 4. $\delta^{15}\text{N}$ gramínea referencia y $\delta^{15}\text{N}$ leguminosa en 319 muestras finalmente utilizadas en este estudio.

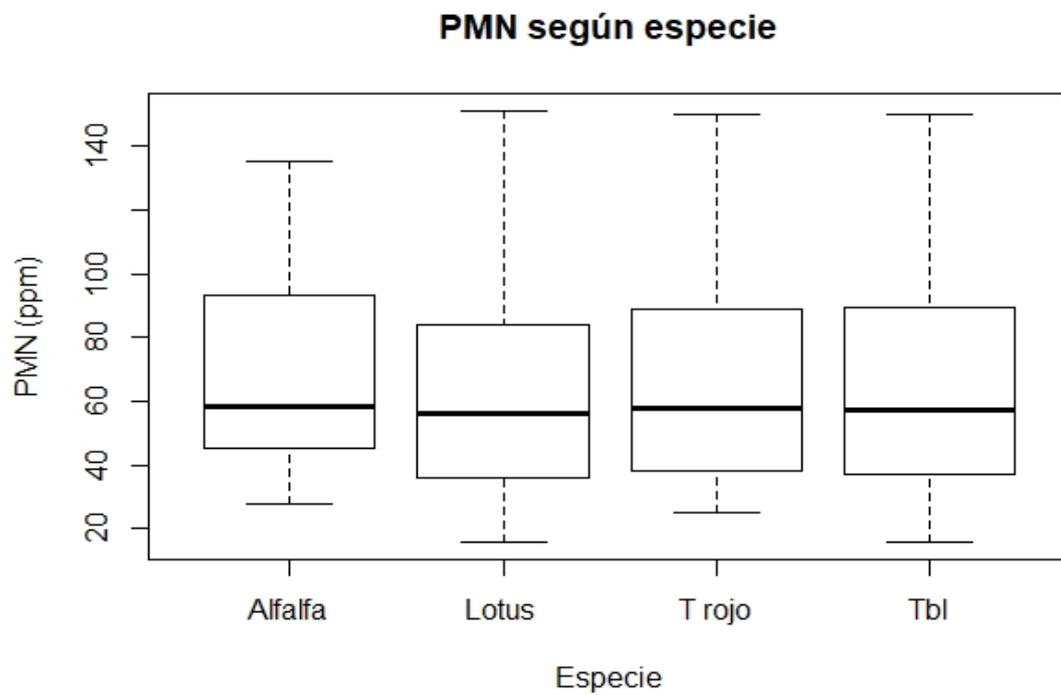


Figura A 5.Boxplot con dispersión de PMN en suelo según especie.

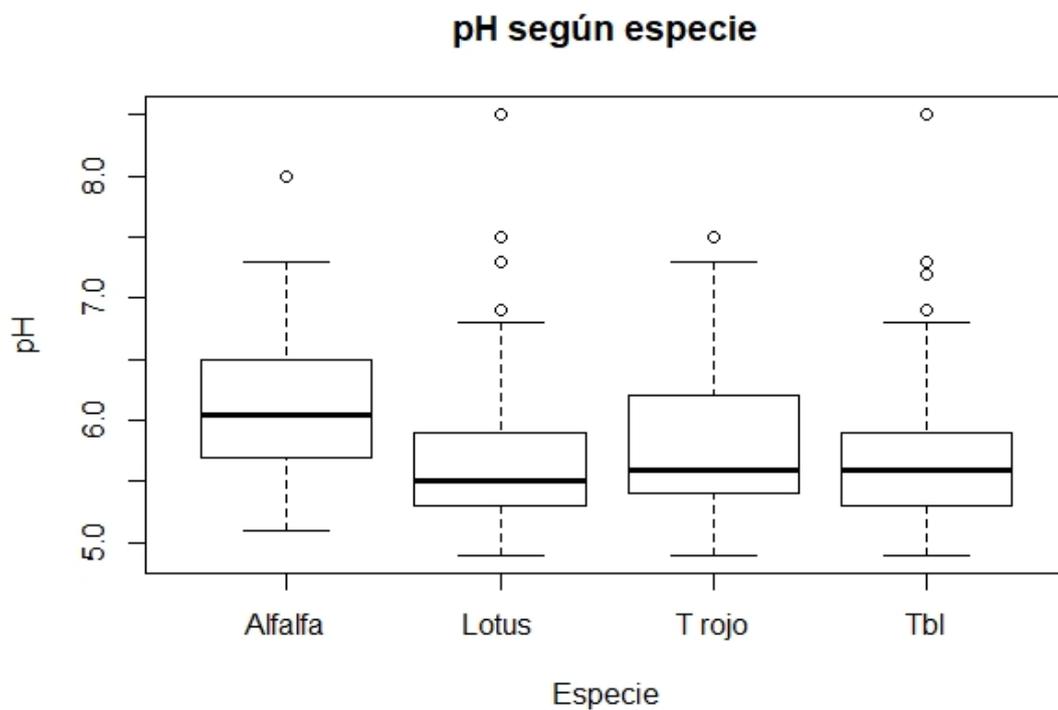


Figura A 6.Boxplot con dispersión de pH en suelo según especie.

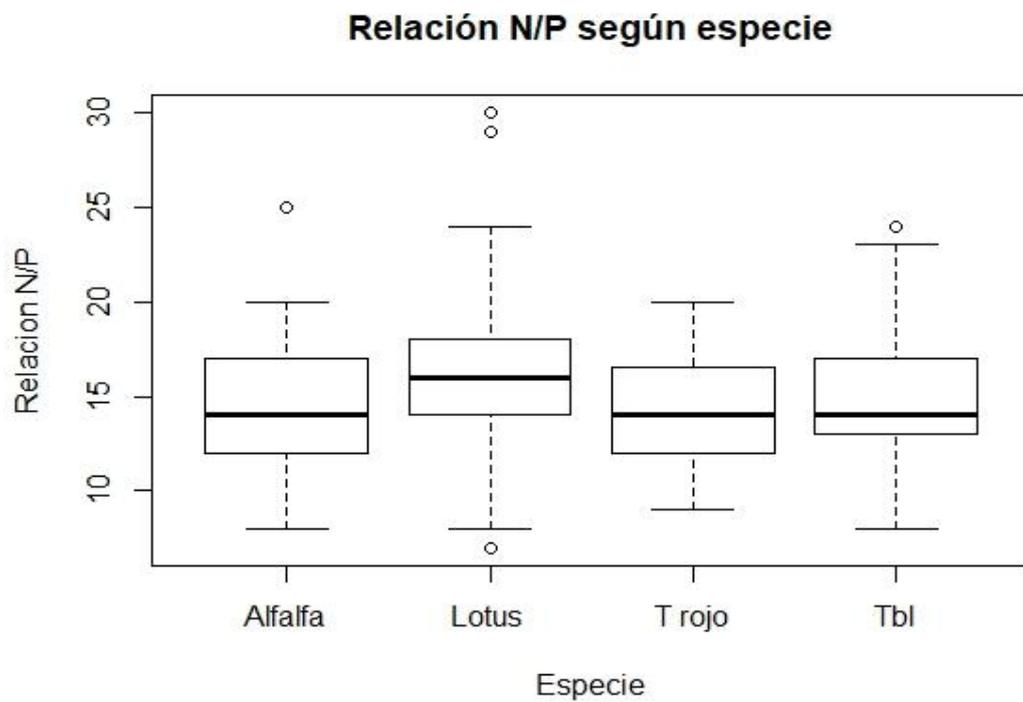


Figura A 7. Boxplot con dispersión de la relación N/P según especie.

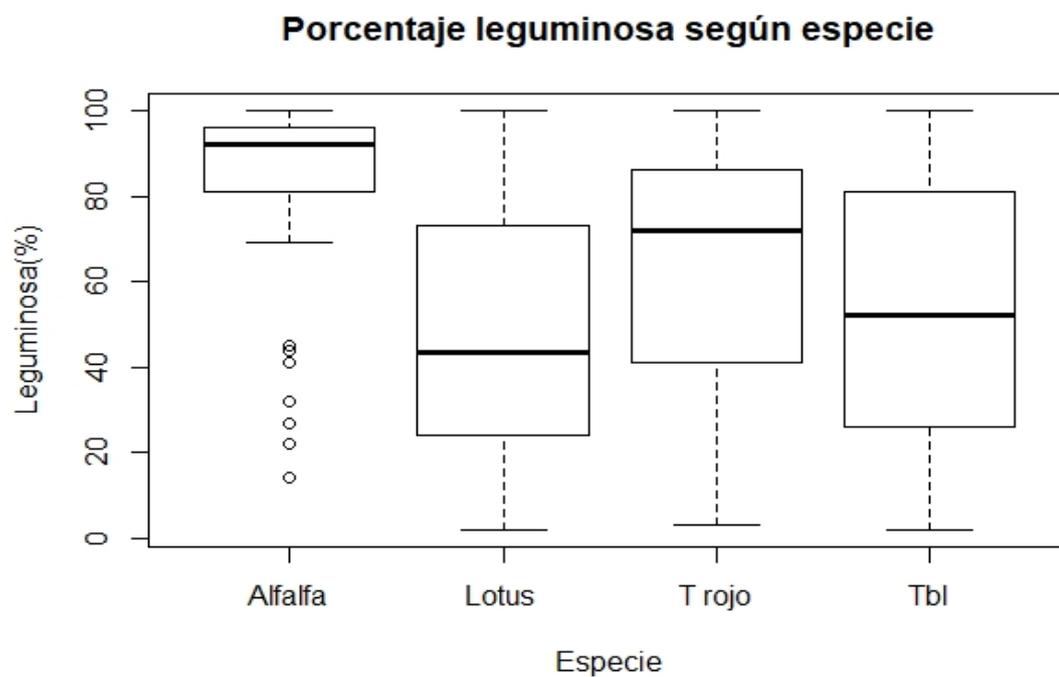


Figura A 8. Boxplot con dispersión del porcentaje de leguminosa en la mezcla según especie.

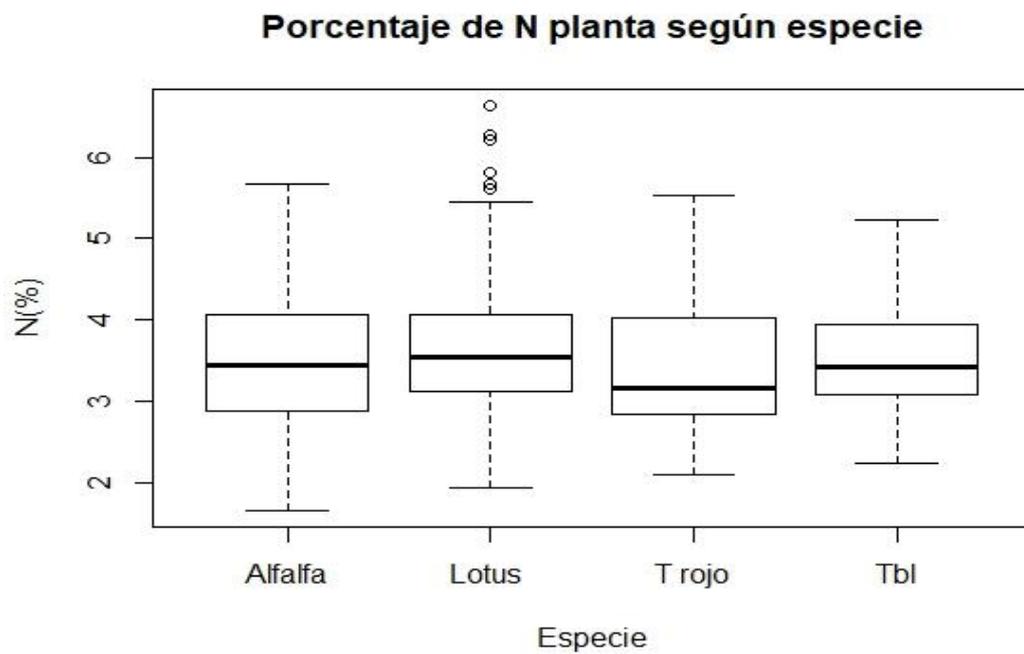


Figura A 9. Boxplot con dispersión del porcentaje de N en planta según especie.

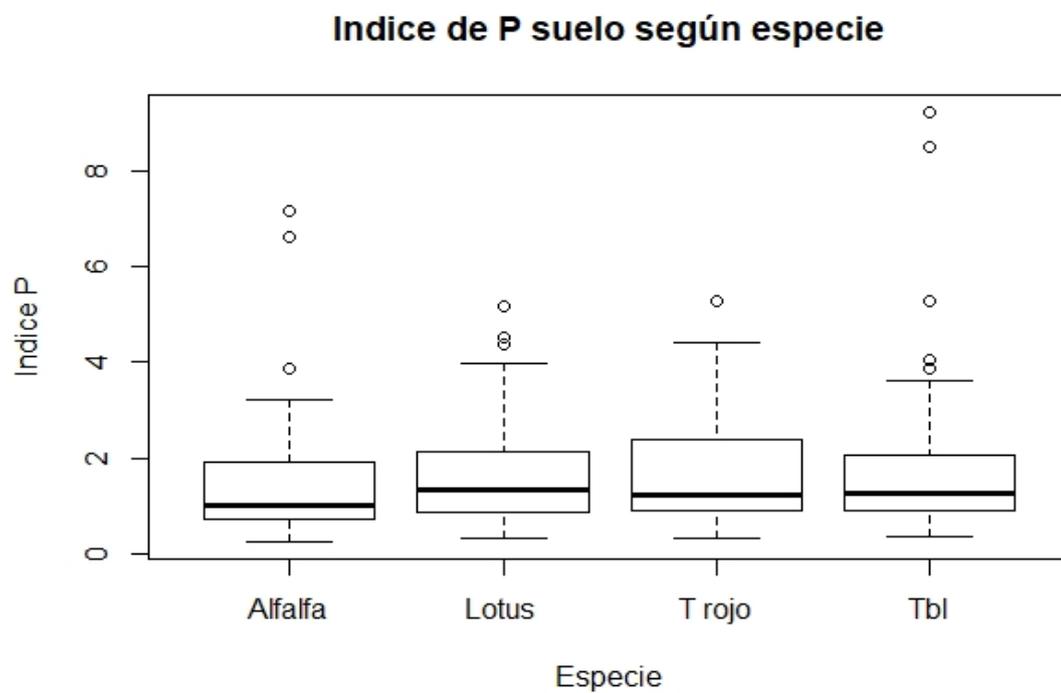


Figura A 10. Boxplot con dispersión de índice de P según especie.

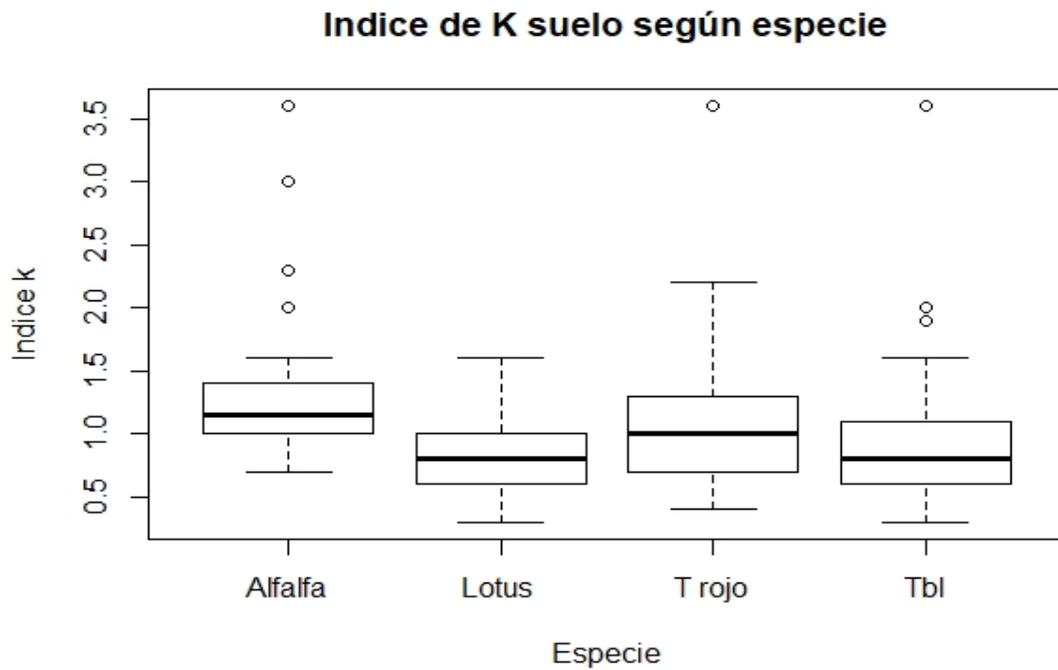


Figura A 11.Boxplot con dispersión de índice de K según especie.

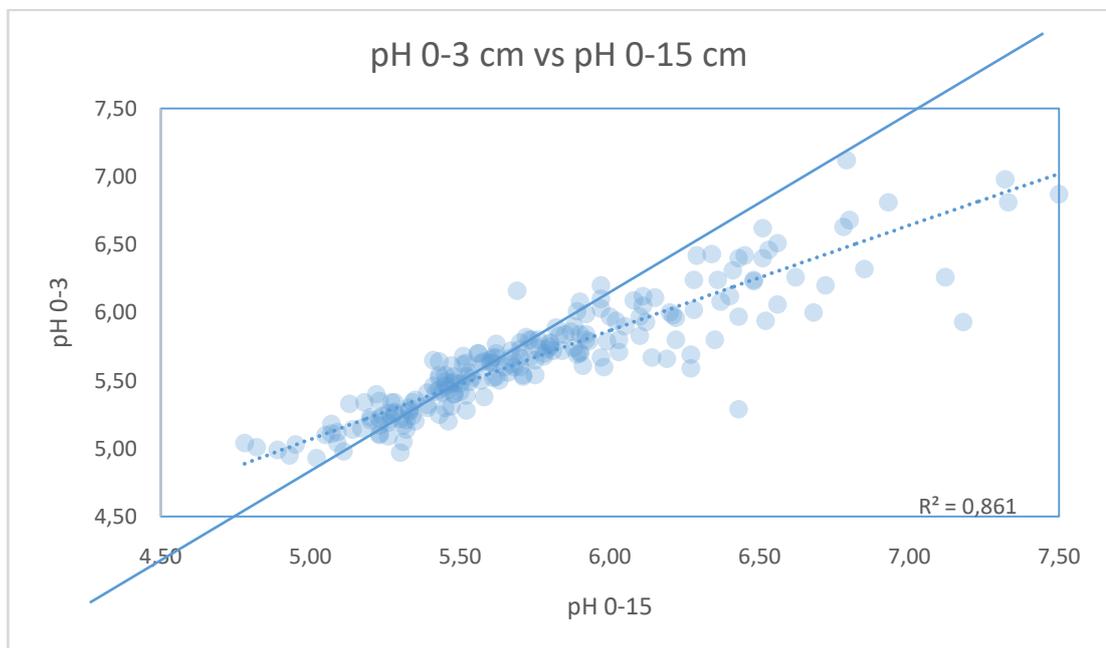


Figura A 12.pH en los primeros 0-3 cm de suelo según pH en los primeros 0-15 cm de suelo.

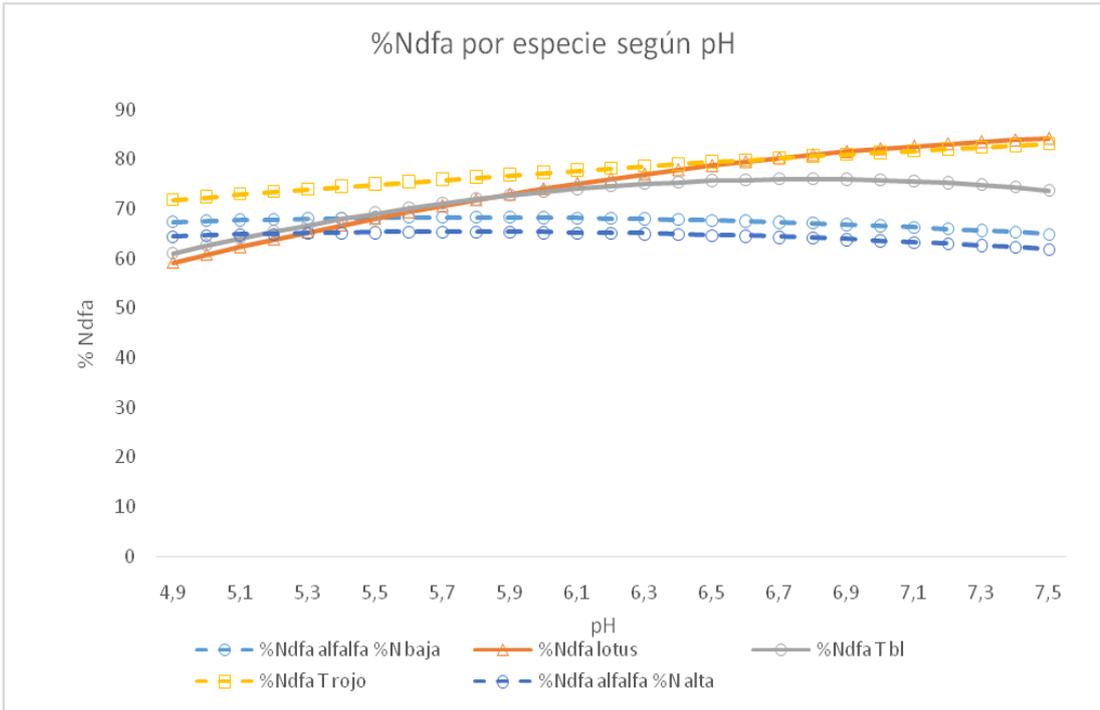


Figura A 13. %Ndfa por especie con valores de mediana de alfalfa según pH.

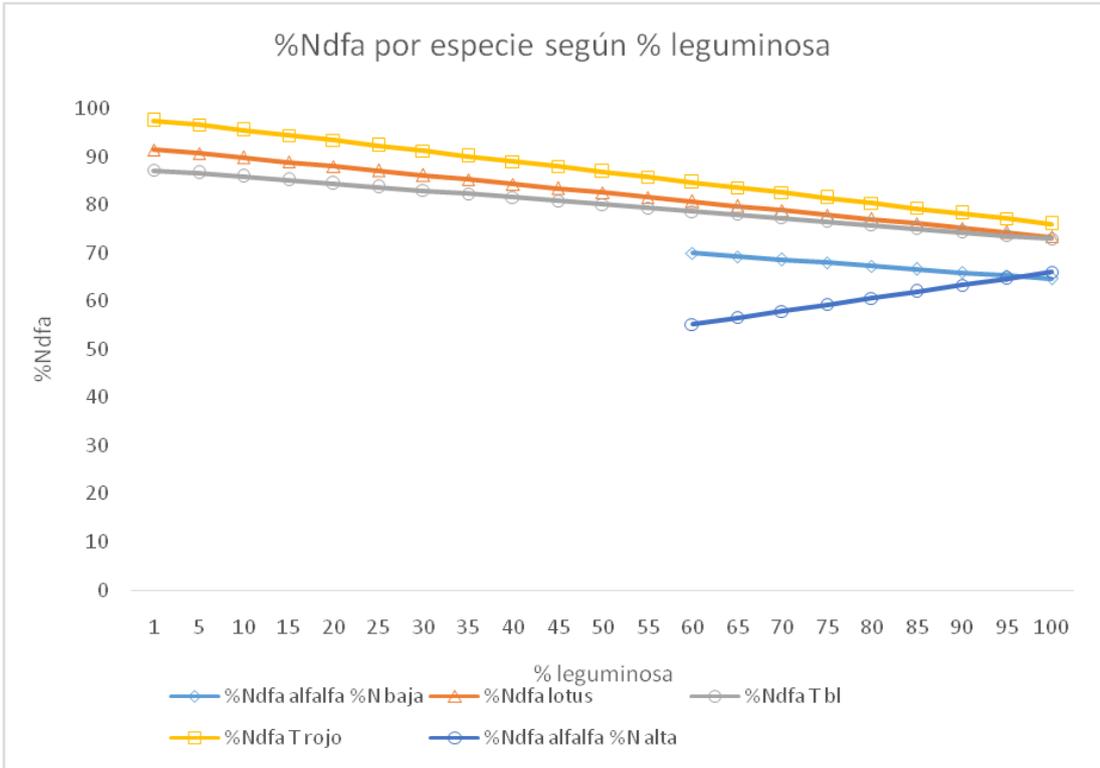


Figura A 14. %Ndfa por especie con valores de mediana de alfalfa según % leguminosas.

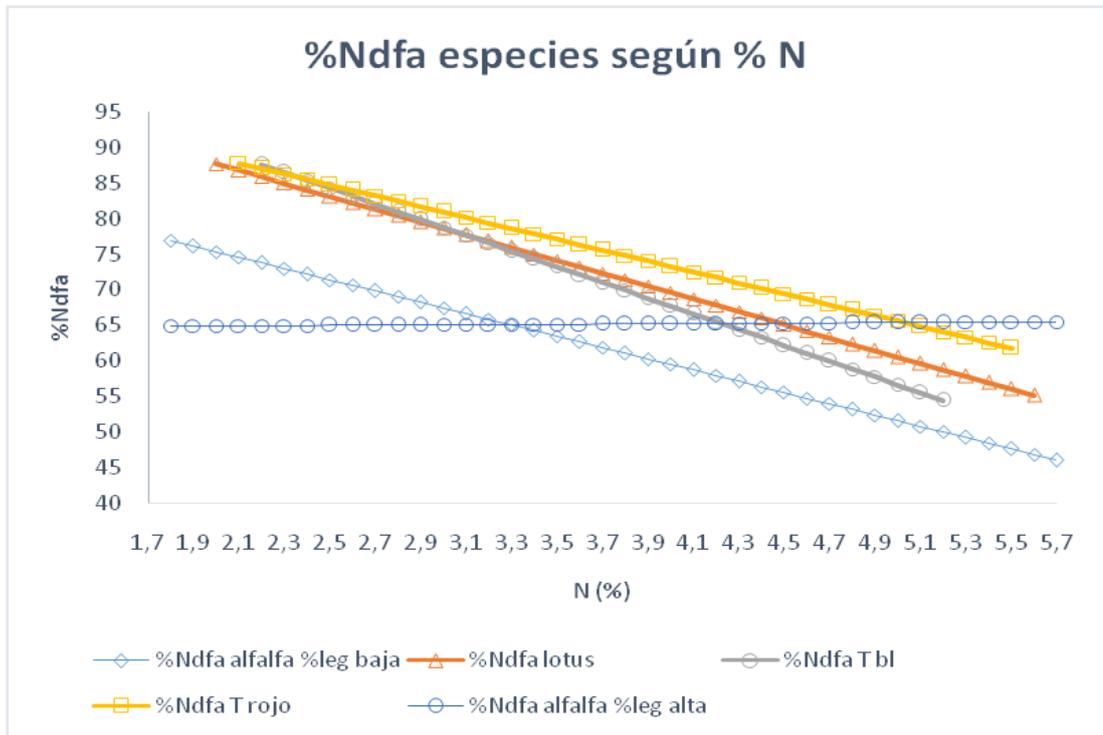


Figura A 15. %Ndfa por especie con valores de mediana de alfalfa según %N planta.

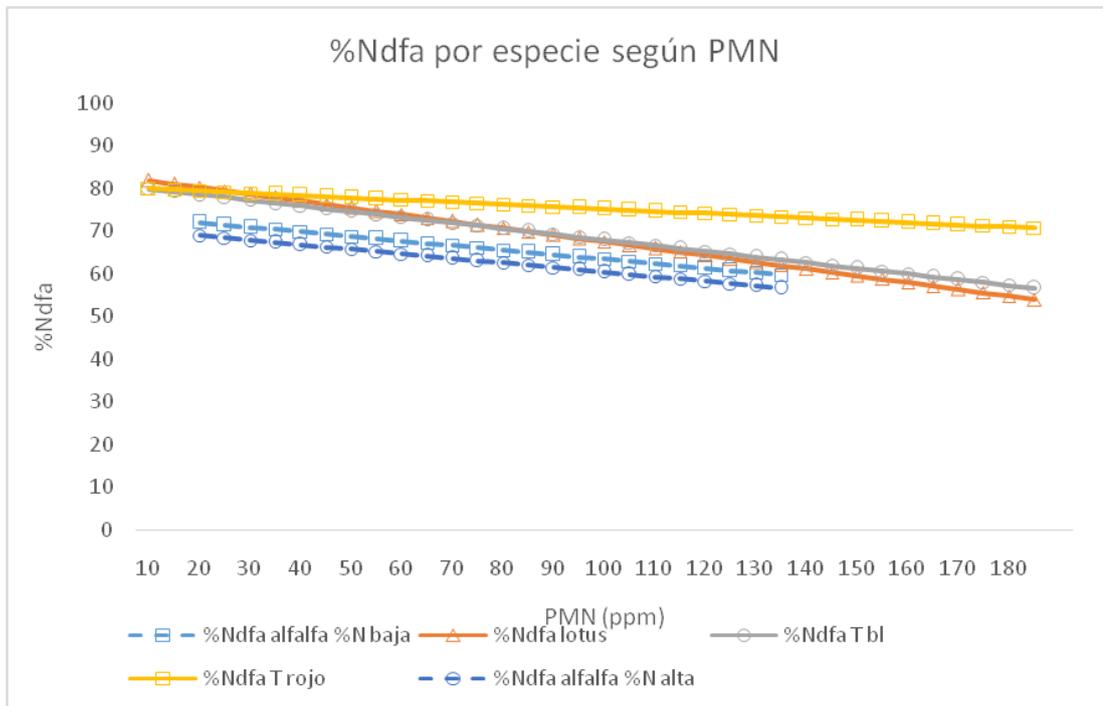


Figura A 16. %Ndfa por especie con valores de mediana de alfalfa según PMN del suelo.

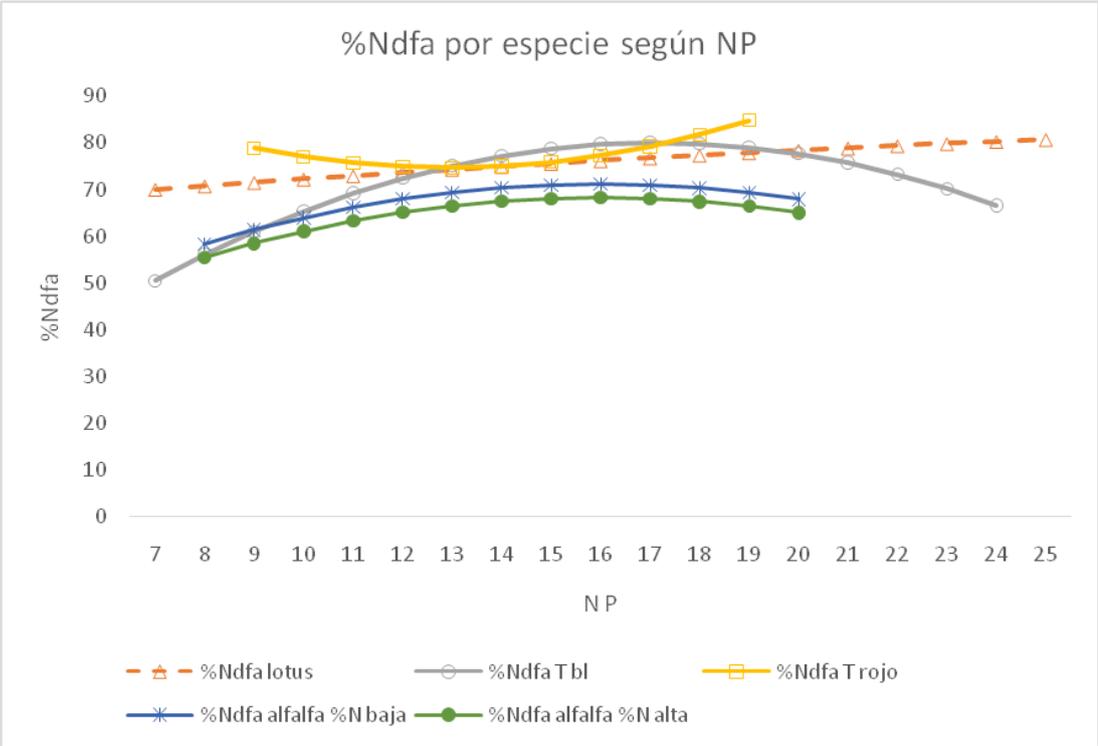


Figura A 12. %Ndfa por especie con valores de mediana de alfalfa según relación N/P en planta.

Cuadro A 1. Modelo completo: principales factores relacionados a %Ndfa para leguminosas (n=292), alfalfa (n=38), lotus (n=100), trébol blanco (n=111) y trébol rojo (n=43) en modelo completo.

Ndfa, Nitrógeno derivado del aire; N, nitrógeno; P, fósforo; PMN, potencial de mineralización del nitrógeno; K, potasio; Ca, calcio; Na, sodio; Mg, magnesio; C.org, carbono orgánico; INN, índice nutrición nitrogenada.

., P < 0,1; *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***P < 0,001

Factor	Coefficiente	e.s	t	RMS E	AIC	R²	Prob >t
Alfalfa							
Ndfa (%)							
Intercepto	209,9	112,17	1,87			0,85	0,08
Satura Na (%)	6,29	1,69	3,71				0,001 **
Ca+Mg/K	1,93	0,39	4,86				9,48e-5 ***
Saturación K (%)	-8,47	5,57	-1,52				0,14
C.org	-13,11	3,15	-4,15				4,88e-5 ***
Índice P	0,45	0,23	1,95				0,07 .
Mg/K	-5,09	1,87	-2,72				0,013 *
Satura Ca (%)	-2,93	0,67	-4,39				2,80e-5***
Temp.15	-8,73	1,85	-4,71				0,0001***
PP15	0,22	0,06	3,90				0,0009 ***
MS	1,52	0,87	1,76				0,094 .
Leguminosa (%)	0,07	0,29	-0,23				0,821
Índice de K	29,1	11,6	2,51				0,02 *
pH2 015	1,56	0,55	2,85				0,009 **
Arcilla	0,73	0,44	1,67				0,11
d13c	-3,98	3,86	-1,03				0,31
Nleg	0,10	0,09	1,17				0,26
N (%)	-9,29	7,92	-1,17				0,25
Lotus							
Ndfa (%)							
Intercepto	77,39	16,3	4,75			0,51	7,5e-6***
PMN (ppm)	-0,16	0,03	-4,64				1,14e-05***
N (%)	-7,8	1,65	-4,72				8,22e-06***
k	43,75	15,95	2,74				0,007**
Leguminosa (%)	-0,20	0,06	-3,65				0,0004***
P Citrico (ppm)	-0,39	0,13	-2,89				0,0047 **
pH 315	8,61	2,62	3,28				0,0015**
Arcilla	-0,32	0,17	-1,82				0,072.
Trébol blanco							
Ndfa (%)							
Intercepto	125,21	10,13	12,35			0,22	2e-16 ***
PMN (ppm)	-0,11	0,04	-2,93				0,004 **
N (%)	-10,17	2,57	-3,92				0,0001***
Leguminosa (%)	-0,14	0,06	-2,45				0,016 *
Trébol rojo							
Ndfa (%)							
Intercepto	244,24	50,80	4,81			0,57	3,25e-05***
Leguminosa (%)	-0,15	0,05	-2,79				0,008 **
N (%)	-8,03	2,16	-3,71				0,00075***
Satura Mg (%)	-0,63	0,34	-1,85				0,074.
P Citrico (ppm)	-0,04	0,02	-2,73				0,018 *

PMN (ppm)	-0,05	0,03	-1,77	0,086 .
Sat Al	-0,49	0,24	-2,06	0,047*
pH03	-29,70	7,70	-3,86	0,000648***
NP2	0,28	0,14	2,03	0,05.
NP	-7,32	4,08	-1,80	0,08.

7.2 BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION VARIABILITY IN FORAGE LEGUMES OF URUGUAY: POSIBLES CAUSES

Biological nitrogen fixation variability in forage legumes of Uruguay: possible causes

Facundo Lussich^{A,B,D}, Gerónimo A. Cardozo^C and Fernando A. Lattanzi^A

^A Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 50 km 11, Colonia 70000, Uruguay.

^B Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av Gral. E. Grazone 780, Montevideo 12900, Uruguay.

^C Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 8 km 281, Treinta y Tres 33000, Uruguay.

^D Corresponding author. Email: flussich@inia.org.uy

Short title. Biological nitrogen fixation.

Summary text. Biological nitrogen fixation variability for different forage legumes in grazing-based production systems is unknown at the national and regional level. Quantifying and understanding the causes of nitrogen fixation variance allows a more accurate estimation of one of the main sources of nitrogen input to these systems and the identification of possible nitrogen fixation problems. This study quantifies and identifies causes of variability in biological nitrogen fixation for Uruguay.

Abstract. Biological nitrogen fixation (BNF) is the main source of nitrogen (N) in pasture-based animal production systems in Uruguay; frequently, the only source. The aims of this work were to quantify the existing variability in the proportion of nitrogen derived from biological nitrogen fixation (%Ndfa) in lotus corniculatus, white clover and red clover in based sown pastures in Uruguay, and analyze to what extent this variation is accounted for by pasture management, soil fertility and plant nutritional status. Between October and November 2018, 206 commercial pastures were sampled throughout the country (excluding pastures in the establishment phase). Vegetation samples were separated into botanical components, and their N and P concentrations measured. A soil sample (0-15 cm) was also obtained to determine pH, nitrogen mineralization potential (NMP, anaerobic incubation), soil extractable P and K (ammonium acetate), and several other chemical parameters. The %Ndfa was estimated by the ^{15}N natural abundance method, using B values from the literature and the ^{15}N content of neighbor grasses as soil reference. The %Ndfa varied substantially in white clover (median 78%, percentile 50%: 66-87%, range 30-100%) and lotus (median 79%, percentile 50%: 65-87%, range 30-100%), and less so in red clover (median 84%, percentile 50%: 74-92%, range 60-100%). Multiple regression analysis ($\alpha=10\%$ statistical significance) revealed that five factors pH, NMP, %legume, and plant %N, and N/P ratio explained 34%, 44% and 42% of this variability in white clover, lotus and red clover respectively. The most relevant factors and their effect on %Ndfa were associated mainly with the balance between plant N demand and soil N supply: NMP (negative), %legume (negative), and %N (negative). This work showed that, opposite to local results from experimental plots, there is ample variability in %Ndfa in Uruguayan pastures, especially in lotus and white clover, the two most used forage legumes species. Soil fertility, and pasture management parameters explained between some 40% of this variation. It is unclear to what extent the remaining variation is due to causes not explored in this study (e.g. rhizobia strains), or simply the result of the precision that the ^{15}N natural abundance technique can attain in Uruguayan soils.

Additional keywords: N^{15} natural abundance method, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus*.

Introduction

Biological nitrogen fixation (BNF) remains as one the main sources of nitrogen (N) input in most pasture based production systems in Uruguay. Therefore, knowing the factors that determine variation in BNF allows a better understanding of the mechanisms that regulate it and allows us to understand under which soil and management conditions N fixation can be favored. Furthermore, allows the identification of possible problems in the legume-rhizobia symbiosis.

The BNF is highly variable depending on the species and environmental conditions. The proportion of plant total N derived from the atmosphere (%Ndfa) can range from 0 to 100% (Riffkin *et al.* 1999, Büchi *et al.* 2015). The variability of %Ndfa depends primarily on soil mineral N availability, soil fertility (mainly phosphorus (P)), and the abundance and competing capacity of soil microsymbionts bacteria among other things (Unkovich 2012). Additionally, nutrient availability is key to the regulation of BNF (Zheng *et al.* 2019). Nutrition with P, potassium (K) and sulphur plays an important role in determining N fixation of legumes (Divito and Sadras 2014).

Those methods which use the stable isotope ^{15}N to estimate BNF are considered the most reliable and provide time integrated values (Unkovich 2012). The natural ^{15}N abundance methodology ($\delta \text{N}15$) is currently the most widely developed technique for field measuring N_2 fixation for temperate legumes. There are few local studies in Uruguay that uses this methodology to estimate BNF in forage legumes. In experimental plots, Mallarino *et al.* (1990) reported that the %Ndfa for forage legumes was larger in winter and spring, with values of 82% and 95% respectively, without significant differences between red clover, white clover and lotus. García *et al.* (1994) using isotopic techniques in field experiments reported average values close to 80% in spring for white clover and lotus.

Information on N fixation variability in forage legumes based pastures throughout the country is scarce, as well as the understanding of the complex causes behind it. Given Uruguayan soil and climate conditions factors likely to affect BNF are soil pH, soil phosphorus, potassium and mineral nitrogen (Barbazán *et al.* 2007; Morón 2008), and legume-rhizobia symbiosis (Irisarri *et al.* 2019).

The objectives of this work were (i) to quantify the existing variability in the proportion of nitrogen derived from biological nitrogen fixation in lotus, white and red clover based pastures in Uruguay, and (ii) to analyze to what extent this variation can be explained by pasture management (legume content), soil chemistry (pH, NMP, P, K), and plant parameters (%N, %P).

Materials and methods

Survey: sites, period, and sampling

A high spatial intensity sampling was carried out in Uruguay (30°-35° S, 53°-58° W) between October and November 2018 covering 206 pastures throughout the country. It included pure legume and mixed legume-grass pastures located in private farms. Ten to fifteen random sites per state were selected, and over one year old pastures were sampled.



Fig. 1. Map of sampled sites.

In each pasture a 20 x 50 cm frame (frame A) with legumes was harvested and the target legumes (*Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus*) were sorted from the rest of the species (grasses or dicotyledons). A second 20 x 50 cm frame (frame B) without legumes was harvested and grasses were sorted from dicotyledons. In each frame the following were quantified: green biomass (kg DM/ha), plant N concentration (g N/g DM), nitrogen stable isotope ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) for each separated species, and plant P concentration in legumes (g P /g DM).

Associated to each frame A, a soil sample of 0-15 cm depth was obtained and 4 soil chemical parameters were determined: pH (potentiometric method), available P (citric acid method), ppm, available K (ammonium acetate), meq /100g soil, and nitrogen mineralization potential (NMP, anaerobic incubation), ppm. The samples were obtained with a 40 mm diameter soil sampler with depth control.

From soil measured parameters, a soil phosphorus index (IP) and a soil potassium index (IK) were calculated as follows:

Phosphorus index (IP) = Soil Citric acid P / Legume Critical P

Where soil citric acid P is the citric acid P level in each soil expressed as ppm; and legume critical P is the soil P level expressed as ppm to achieve optimal pasture growth.

Potassium index (IK) = Soil exchangeable K / Legume critical K

Where soil exchangeable K is the exchangeable K in each soil expressed as meq /100g soil; and legume critical K is the soil exchangeable K level expressed as meq /100g soil to achieve optimal pasture growth.

From plant measured parameters, legume nitrogen-phosphorus (N/P) ratio and legume content in the pasture was estimated as follows:

% legume = (g legume DM/g total DM)*100

Where g legume DM is the grams of dry matter of the legume in the frame and g total DM is the grams of total dry matter in the frame.

To analyze possible causes of % Ndfa variation, 5 to 7 potentially explanatory factors related to soil, plant and pasture management were used. Of which 4 were soil-related (NMP, pH, IP, IK), 2 were plant-related (%N, N/P) and 1 was related to pasture management (%legume).

Estimation of N fixation with N15 natural abundance method

The proportion of total N derived from the atmosphere (% Ndfa) was estimated as follows:

%Ndfa = $[(\delta^{15}\text{N reference} - \delta^{15}\text{N legume}) / (\delta^{15}\text{N reference} - B)] \times 100$

Where $\delta^{15}\text{N}$ is the enrichment in ^{15}N compared to standard of atmospheric N_2 (0.3663%) expressed as parts per thousand (‰); $\delta^{15}\text{N reference}$ is the $\delta^{15}\text{N}$ of the non-fixing plant; $\delta^{15}\text{N legume}$ is the $\delta^{15}\text{N}$ of the legume species; B is the $\delta^{15}\text{N}$ of the legume totally dependent on atmospheric N_2 as source of N.

In the current study the grass in frame A was used as the reference species, or the dicotyledonous of that same frame in cases where the former was not present. This is justified since there was a high degree of correlation between the two species as shown in annexes Figure 1. When no grasses or dicotyledonous were present in frame A then frame B species were used. Correlation between frame A and frame B species are shown in annexes Figure 2. Finally, table values for each legume species reported by Unkovich *et al.* (2008) were used as B value.

Seven samples were discarded where the $\delta^{15}\text{N}$ of the reference species was less than 2‰ because under those circumstances the method has little precision and induces errors in the estimation of the %Ndfa (Unkovich *et al.* 1994).

Statistical analysis

A first exploratory analysis of the data was carried out by calculating the descriptive statistical estimators. Subsequently, %Ndfa was analyzed by multiple regressions to determine whether relationships existed between this variable and management, soil and pasture factors measured. Interactions between factors were considered. A p-value <0.1 was accepted as statistically significant and a p-value <0.2 was accepted as statistically significant trend. Firstly, five factors (pH, NMP, %legume, % N, and N/P) were related to %Ndfa variations (basic model). Secondly, two additional factors (IP, IK) were added to the basic model to observe if they increased R^2 (basic model P+K). All statistical analyses were performed using R studio software.

Results

The overall average %Ndfa for legumes was 76%, and 76, 75 and 84% for lotus, white and red clover respectively. A marked difference between species was observed for the lower quarter of the data (Fig.2). All red clover samples reached values of %Ndfa above 60%, while the lower 25% samples of lotus and white clover were below 60%.

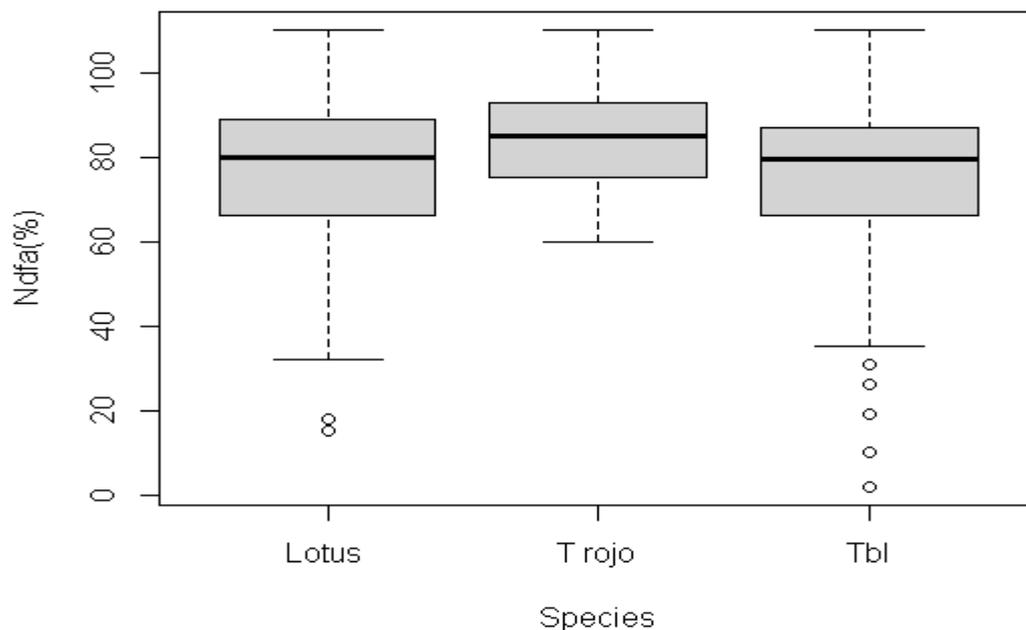


Fig. 2. Percentage of total N derived from atmosphere (%Ndfa) variance by species.

The sites surveyed displayed a wide range of soil pH, P, and K levels. The same happen to plant parameters, %N and %P, as well as legume content in the pasture. Moreover, all species sites showed a similar range of plant and soil levels, faithfully representing plant and soil environment conditions of Uruguayan pastures. A summary of the maximum, minimum, medium and mean values of seven factors observed in 206 pastures is presented in annexes Table 1.

The equations coefficients derived from the first analysis are shown in Table 1 (basic model). Legume percentage, plant %N and soil NMP had a significant linear negative relationship with %Ndfa for all species. No statistical significance interactions were found between any of the variables of the basic model. Soil pH showed a non-linear association with %Ndfa, and only significant for white clover, and with a significant trend for lotus. Plant N/P ratio showed a non-linear association with %Ndfa, only significant for white clover and with a significant trend in red clover.

Table 1. Statistical factors related to %Ndfa for lotus (n=100), white clover (n=111) y red clover (n=43). Basic model.

Ndfa, Nitrogen derived from atmosphere; N, nitrogen; P, phosphorus; NMP, nitrogen mineralization potential.

.,P < 0.2; *, P < 0.1; **, P < 0.05; ****P < 0.01

Factor	Coefficient	s.e	t	R ²	Prob >t
<i>Lotus</i>					
Ndfa (%)					
Intercept	-36.6	88.15	-0.41	0.44	0.68
NMP (ppm)	-0.16	0.032	-4.99		2.81e-6****
Legume (%)	-0.18	0.262	-3.25		0.0016****
pH 0-15	41.6	28.03	1.49		0.14.
pH 0-15 ²	-2.60	2.20	-1.17		0.25
N/P	0.91	1.97	0.46		0.64
N/P ²	-0.01	0.054	-0.19		0.85
N (%)	-9.03	2.08	-4.3		3.6e-5****
<i>White clover</i>					
Ndfa (%)					
Intercept	-139.5	97.10	-1.47	0.34	0.15.
NMP (ppm)	-0.13	0.036	-3.67		0.0003****
Legume (%)	-0.14	0.058	-2.47		0.015****
pH 0-15	57.97	30.23	1.92		0.057*
pH 0-15 ²	-4.27	2.37	-1.80		0.074*
N/P	9.79	2.87	3.41		0.0009****
N/P ²	-0.29	0.09	-3.22		0.0016****
N (%)	-11.05	3.04	-3.63		0.0004****
<i>Red clover</i>					
Ndfa (%)					
Intercept	126.68	135.58	0.93	0.42	0.36
NMP (ppm)	-0.05	0.031	-1.72		0.094*
Legume (%)	-0.216	0.06	-3.76		0.0006****
pH 0-15	9.63	40.45	0.24		0.81
pH 0-15 ²	-0.43	3.21	-0.14		0.89
N/P	-7.01	4.34	-1.16		0.12.
N/P ²	0.27	0.15	1.85		0.07*
N (%)	-7.66	2.36	-3.2		0.0025****

The equations coefficients derived from the second analysis are shown in Table 2 (basic P+K model). Soil P and K index added to the basic model increases by 0.01 to 0.08 the determination coefficients depending on the species. The signs of the coefficients of the 5 factors in the basic model maintained the same direction in the basic P+K model. On one hand, soil P index was positively and not significantly related to %Ndfa in white clover, but negatively and significantly related to %Ndfa in red clover and lotus. On the other hand, soil K was index negatively and significantly related to %Ndfa in white clover, but positively related to %Ndfa in lotus and red clover, without statistical significance in the latter species. It should be noted that in all species P and K index have opposite signs.

Table 2. Statistical factors related to %Ndfa for lotus (n=100), white clover (n=111) y red clover (n=43). Basic P+K model.

Ndfa, Nitrogen derived from atmosphere; N, nitrogen; P, phosphorus; NMP, nitrogen mineralization potential; IP, Phosphorus index; IK, Potassium index.

.,P < 0.2; *, P < 0.1; **, P < 0.05; ****P < 0.01

Factor	Coefficient	s.e	t	R ²	Prob >t
<i>Lotus</i>					
Ndfa (%)					
Intercept	-11.66	88.38	-0.13	0.48	0.89
NMP (ppm)	-0.18	0.034	-5.41		5.14e-6***
Legume (%)	-0.20	0.059	-3.36		0.0011***
pH 0-15	35.5	28.82	1.23		0.22
pH 0-15 ²	-2.16	2.26	-0.96		0.34
N/P	0.29	1.97	0.15		0.88
N/P ²	-0.001	0.053	-0.03		0.98
N (%)	-8.33	2.04	-4.1		9.6e-5***
IP	-2.74	1.41	-1.94		0.054*
IK	9.83	6.03	1.63		0.107.
<i>White clover</i>					
Ndfa (%)					
Intercept	-170.7	100.22	-1.70	0.35	0.09*
NMP (ppm)	-0.11	0.038	-2.99		0.003***
Legume (%)	-0.16	0.059	-2.67		0.0086***
pH 0-15	69.75	31.61	2.21		0.029**
pH 0-15 ²	-5.17	2.47	-2.09		0.038**
N/P	9.71	2.88	2.88		0.001***
N/P ²	-0.29	0.09	-3.22		0.0016***
N (%)	-11.06	3.08	-3.58		0.0005***
IP	0.43	0.36	1.19		0.24
IK	-7.52	5.18	-1.45		0.15.
<i>Red clover</i>					
Ndfa (%)					
Intercept	121.6	132.24	0.92	0.50	0.36
NMP (ppm)	-0.06	0.03	-1.89		0.067*
Legume (%)	-0.20	0.06	-3.57		0.0011***
pH 0-15	16.65	39.87	0.42		0.68
pH 0-15 ²	-0.99	3.15	-0.31		0.76
N/P	-9.5	4.27	-2.22		0.033**
N/P ²	0.34	0.14	2.36		0.024**
N (%)	-6.94	2.28	-3.05		0.0045***
IP	-0.57	0.28	-2.02		0.051*
IK	2.85	4.61	0.62		0.541

Discussion

This study covers an important geographical extension and for the first time allows quantifying the N fixation variability for the three main forage legumes used in Uruguayan sown pastures. The %Ndfa variations were of different magnitude according to the species, being approximately between 60 and 100% for red clover, and between 30 and 100% for lotus and white clover. Red clover was the species with less %Ndfa variation range and higher %Ndfa average value. These data add to the really scarce regional information on BNF in legume pastures at private farms.

In studies where surveys were carried out with a similar scale to the present work, a wide range of %Ndfa were found, even greater than those reported in this study. Riffkin *et al.* (1999) reported %Ndfa variations of 0-100% and 0-95% for white clover in light and medium textured soils of South Australia, with average values of 67% and 60% in the same order. In general, %Ndfa variations observed in the present study were of a smaller range than the ones reported in the international literature, but showed more %Ndfa variation than local studies carry out at experimental plots (Mallarino *et al.* 1990, García *et al.* 1994).

It is widely reported in the literature that soil available N mineral is one of the main factors in determining the %Ndfa in legumes (Ledgard and Steele 1992; Sadowsky 2005; Unkovich 2012). This N supply will be subject not only to soil N levels, but also to amount of mineral N accessible to the legume. The latter is largely determined by legume content in the mixture. The addition of grass in a forage mixture enhances the BNF (Hardarson *et al.* 1988), since they are better competitors than legumes for mineral N (Butler and Ladd 1985). Mallarino and Wedin (1990) argued that the effect of the legume content in %Ndfa may be quantitatively different depending on the legume species. However, this has been scarcely explored in the literature. In the present study, the % legume was significantly related to %Ndfa in both models for all three species studied, but with different magnitude in the effect, being white clover the species with apparently least sensitivity in terms of %Ndfa decrease per unit change in the % legume in the sward.

On the other hand, kg of applied N fertilizer and soil NMP are direct indicators of the amount of soil mineral N available in the short-medium term. Mallarino *et al.* (1990) reported lower %Ndfa values in summer for different legumes, and attributed it to a higher supply of soil mineral N as a result of higher temperatures and mineralization of organic matter in the growing season. In the presence of high soil mineral N concentrations, legumes downregulate BNF since it is a plant high energy cost process (Sprent and Raven, 1985). In the present study, soil NMP was significantly and negatively related to %Ndfa for all legume species. These findings are consistent with what is widely reported in the literature and confirms that soil N availability is a key factor in regulating %Ndfa. Although nitrogen fertilization in each pasture was reported by farmers, it was not possible to use the information due to uncertainty in the data.

The effect that plant N demand and concentration have in %Ndfa regulation is less explored in the literature. In the present study, all legumes showed a significant negative relationship between plant %N and %Ndfa, but white clover appeared to be slightly more sensitive than lotus and red clover. Furthermore, for white clover plant ratio N/P and %Ndfa showed a non-linear response where high N/P ratios were associated to lower %Ndfa and low N/P ratios were associated with higher %Ndfa. It seems that a plant self-regulation based on the supply and demand of N according to P concentration could be feasible in white clover. This idea can be supported by Güsewell (2004) findings, who showed that it is highly probable a biomass production response to nitrogen fertilization when plant ratio N/P is less than 10, and a response to phosphate fertilization when plant ratio N/P is higher than 20. Therefore, these findings supports the idea that a mechanism associated to plant N demand (%N or N/P) can regulate to a greater or lesser extent the %Ndfa.

The soil chemical environment is a well-known listed factor with an important proven effect on BNF (Ledgard and Steele 1992; Sadowsky 2005; Unkovich 2012). However, in the present study it is demonstrated that the chemical environment is a factor of little impact in explaining %Ndfa variation in Uruguay.

In general, acid soil pH influence symbiosis by affecting rhizobia survival and the infection process between bacteria and plant (Cooper and Scherer 2012). Furthermore, low soil pH affects nutrients availability, including soil P, and heavy metals such as aluminum become more soluble (Sadowsky 2015). White clover requires soils pH higher than 5.5 for adequate growth (Davies 1992), and it is reported that legumes are more sensitive to acidic soil pH than grasses (Caradus 1980). Hackney *et al.* (2019) reported higher nodulation scores in *Trifolium spp.* in soils with pH higher than 5.55 in Australia. In the present study, soil pH was significantly and negatively related to %Ndfa for white clover in both models, and with significant trend for lotus only in the basic model. Therefore, soil pH was a low impact factor in explaining %Ndfa variations. This is supported by Riffkin *et al.* (1999) who reported no association between %Ndfa and soil pH or exchangeable aluminium in white clover based pastures of Australia.

A P deficiency directly affects the BNF by reducing the number and size of nodules (Sanz-Saez *et al.* 2017) and in severe cases inhibits nodulation (Almeida *et al.* 2000); and indirectly by affecting plant photosynthesis and growth (Cooper and Scherer 2012). Soil K directly affects the BNF by its effect on nodule formation, growth and activity (Duke *et al.* 1980); and indirectly by affecting the growth and development of legumes (Premaratne and Oertli 1994). Divito and Sadras (2014) argued that P and K deficiencies affect nodule number and growth more than biomass growth of legumes. Therefore, P and K index were included in the basic P+K model. P index was significantly and negatively related to %Ndfa for lotus and red clover, but positively related to %Ndfa for white clover. In contrast, K index was positively related to %Ndfa for lotus and red clover, and negatively for white clover. Overall, these nutrients accounted at most for 8% of the variance found in %Ndfa.

A possible explanation for the low impact of these nutrients in the model is that in the present study both soil P and K levels were often not deficient for legume development and growth. Almost 65% of the samples taken had a soil P index equal or greater than 1, that is, with soil P levels higher than the critical levels reported for those species, which was unexpected since soils in Uruguay are usually thought to be mostly naturally deficient in P (Carámbula 2002). Likewise, K index with demanding critical levels (0.40 meq/100g) was equal or higher than 1 in 40% of cases, and equal or higher than 0.8 in 60% of cases. What is more, with less demanding critical levels (0.34 meq/100g), K index was equal or greater than 1 in approximately 54% of cases, and equal or greater than 0.8 in 71%. Somado *et al.* (2006) reported that the addition of P as a fertilizer affected the total N absorbed by legumes more than the %Ndfa itself. However, Riffkin *et al.* (1999) reported a direct association between soil P and K with %Ndfa in medium-textured and light-textured soils. In the previous mentioned study soil K were also rarely deficient for this nutrient. In addition Hackney *et al.* (2019) reported higher nodulation scores in *Trifolium spp.* pastures when the ratio between available P : critical P exceeded 0.67.

It should be noted that in the basic P+K model, soil P and K index in all cases have opposite signs which could indicate an antagonism between these nutrients. James *et al.* (1995) reported that P fertilization in lucerne based pastures indirectly affects plant K concentration, since the addition of P has a positive effect on plant Na, Ca and Mg concentration, so it also increases the mutual antagonism existing between these four cations. Moreover, in the study carried out by Riffkin *et al.* (1999) something similar is reported for nitrogen fixed medium-textured soils, where the soil P and K have opposite effects on kg of N fixed per tonne herbage dry matter in white clover.

The five factors used in the basic model accounted for 34 to 44% of %Ndfa variation, and the seven factor used in the basic P+K model accounted for 35 to 50%. In summary, the factors included in the basic model explained most of %Ndfa variation for the three legumes studied.

Conclusions

The variation in %Ndfa in the three most widely used forage legumes species in Uruguay was higher than that previously reported at the level of experimental plots, but lower than that reported by similar studies conducted on white clover pastures in Australia.

Red clover was the species with less %Ndfa variation and higher %Ndfa average values.

In the three species, the variation in %Ndfa was associated mainly to mechanisms related to the balance between soil nitrogen availability (PMN, %leguminous) and plant nitrogen demand (N concentration and N/P ratio): high concentrations of plant nitrogen or soil mineral nitrogen led to lesser proportions of atmospheric nitrogen in the plants.

Whereas the mechanism mentioned above explained some 40% of %Ndfa variance, and soil chemical properties did not affect in any major way the nitrogen fixation of the three legumes species, there remains to be established whether other factors not assessed in the present study could account for the remaining variability.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was financed by the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, and the Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur.

References

- Almeida PF, Hartwig UA, Frehner M, No J, Lu A (2000) Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **51**, 1289-1297.
- Barbazán M, Ferrando M, Zamalvide J (2007) Estado nutricional de *Lotus corniculatus* L. en Uruguay. *Agrociencia* **1**, 22-34.
- Büchi L, Gebhard CA, Liebisch F, Sinaj S, Ramseier H, Charles R (2015) Accumulation of biologically fixed nitrogen by legumes cultivated as cover crops in Switzerland. *Plant and Soil* **393**, 1-13.
- Butler JHA, Ladd JNL (1985) Growth and nitrogen fixation by *Medicago littoralis* in pot experiments: effect of plant density and competition from *Lolium multiflorum*. *Soil Biology and Biochemistry* **17**, 355-361.
- Caradus JR, (1980). Distinguishing between grass and legume species for efficiency of phosphorus use. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **23**, 75-81.
- Carámbula M (2002) Potenciales y alternativas para producir forraje. In 'Pasturas y forrajes: potenciales y alternativas para producir forraje'. (Ed M Carámbula) pp. 1-39. (Hemisferio Sur: Montevideo)
- Cooper JE, Scherer HW (2012) Nitrogen fixation. In 'Marschner's Mineral Nutrition of High Plants.' (Ed P Marschner) pp. 389-408. (Elsevier Ltd: London)
- Davies A (1992) White clover. *Biologist* **31**, 129-133.
- Divito GA, Sadras VO (2014) How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crops Research* **156**, 161-171.
- Duke SH, Collins M, Soberalske RM (1980) Effects of potassium fertilization on nitrogen fixation and nodule enzymes of nitrogen metabolism in alfalfa. *Crop Science* **20**, 213-219.
- García J, Labandera C, Pastorini D, Curbelo S (1994) Fijación de nitrógeno por leguminosas en La Estanzuela. Nitrógeno en pasturas, *INIA Serie Técnica* N° 51, Montevideo.
- Güsewell S (2004) N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist* **164**, 243-266.
- Hackney BF, Jenkins J, Powells J, Edwards CE, De Meyer S, Howieson JG, Yates RJ, Orgill SE (2019) Soil acidity and nutrient deficiency cause poor legume nodulation in the permanent pasture and mixed farming zones of south-eastern Australia. *Crop and Pasture Science* **70**, 1128-1140.

- Hardarson G, Danso SKA, Zapata F (1988) Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. *Crop Science* **28**, 101-105.
- Irisarri P, Cardozo G, Tartaglia C, Reyno R, Gutiérrez P, Lattanzi FA, Rebuffo M, Monza J (2019) Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover. *Frontiers in Microbiology* **10**, 768.
- James DW, Hurst CJ, Tindall TA (1995) Alfalfa cultivar response to phosphorus and potassium deficiency: Elemental composition of the herbage. *Journal of Plant Nutrition* **18**, 2447-2464.
- Ledgard SF, Steele KW (1992) Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil* **141**, 137-153.
- Mallarino AP, Wedin WF (1990) Nitrogen fertilization effects on dinitrogen fixation as influenced by legume species and proportion in legume-grass mixtures in Uruguay. *Plant and Soil* **124**, 127-135.
- Mallarino AP, Wedin WF, Goyenola RS, Perdomo CH, West CP (1990) Legume species and proportion effects on symbiotic dinitrogen fixation in legume-grass mixtures. *Agronomy Journal* **82**, 785-789.
- Morón A (2008) Relevamiento del estado nutricional y la fertilidad del suelo en cultivos de trébol blanco en la zona este de Uruguay. *INIA Serie Técnica* N° 172, Montevideo.
- Premaratne JP, Oertli JJ (1994) The influence of potassium supply on nodulation, nitrogenase activity and nitrogen accumulation of soybean (*Glycine max L. Merrill*) grown in nutrient solution. *Fertilizer Research* **38**, 95-99.
- Riffkin PA, Quigley PE., Kearney G, Cameron FJ, Gault RR, Peoples MB, Thies JE (1999) Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 261-272.
- Sadowsky MJ (2005) Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In 'Nitrogen Fixation in Agriculture; Forestry, Ecology, and the Environment'. (Eds D Werner, WE Newton) pp. 89-112. (Springer: Dordrecht)
- Sanz-Saez A, Morales F, Arrese-Igor C, Aranjuelo I (2017) P Deficiency: A Major Limiting Factor for Rhizobial Symbiosis. In 'Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability.' (Eds S Sulieman, LS Phan) pp. 21-40. (Springer International Publishing: Cham)
- Sprent JI, Raven JA (1985) Evolution of nitrogen-fixing symbioses. *Proceedings of Royal Society of Edinburgh* **85B**, 215-237.
- Somado EA, Sahrawat KL, Kuehne RF (2006) Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biology and Fertility of Soils* **43**, 123-130.

Unkovich M (2012) Nitrogen fixation in Australian dairy systems: Review and prospect. *Crop and Pasture Science* **63**, 787-804.

Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey R, Giller K (2008) 'Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems.' (ACIAR: Canberra)

Unkovich MJ, Pate JS, Sanford P, Armstrong EL (1994) Potential precision of the d15N natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in southwest Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* **45**, 119-132.

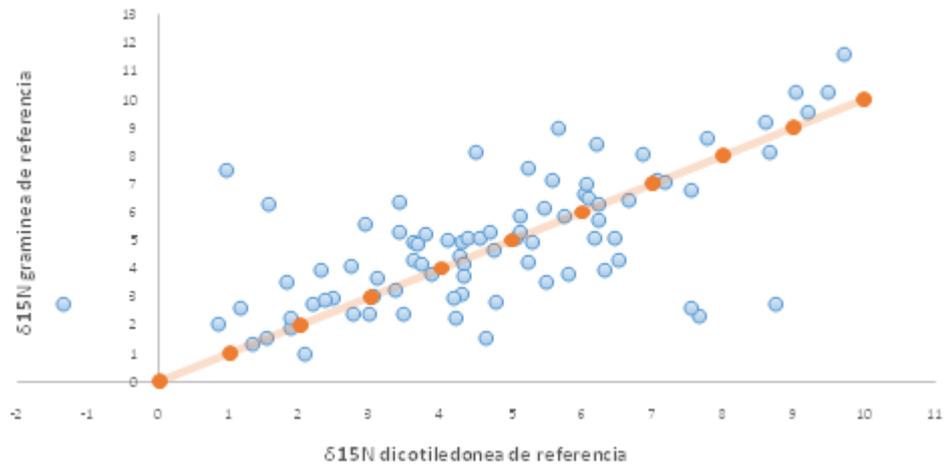
Zheng M, Zhou Z, Luo Y, Zhao P, Mo J (2019) Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. *Global Change Biology* **25**.

Annexes

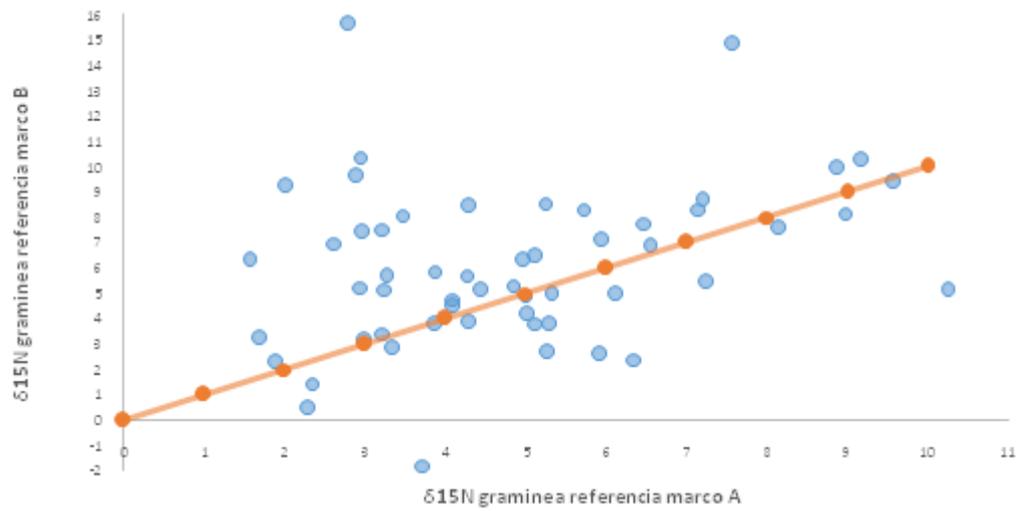
Annexes Table 1. Summary values of seven factors examined in a survey for lotus (n=100), white clover (n=111) y red clover (n=43)

N, nitrogen; P, phosphorus; NMP, nitrogen mineralization potential; IP, Phosphorus index; IK, Potassium index.

Factor	Mean	Median	Min.	Max.
		<i>Lotus</i>		
NMP (ppm)	73	56	23	186
Legume (%)	48	43	2	100
pH 0-15	5.8	5.5	4.9	7.5
N/P	15	16	8	20
N (%)	3.7	3.6	1.9	6.6
IP	1.6	1.3	0.3	5.8
IK	0.8	0.8	0.3	1.6
		<i>White clover</i>		
NMP (ppm)	68	58	16	189
Legume (%)	51	47	2	100
pH 0-15	5.7	5.6	4.9	8.5
N/P	15	14	8	30
N (%)	3.5	3.4	2.2	5.2
IP	2.0	1.3	0.3	8.4
IK	0.9	0.9	0.3	3.6
		<i>Red clover</i>		
NMP (ppm)	68	59	14	185
Legume (%)	55	57	2	100
pH 0-15	5.7	5.6	4.9	8.5
N/P	16	14	7	29
N (%)	3.6	3.2	2.1	5.5
IP	2.7	1.3	0.3	5.8
IK	1.1	1.0	0.4	3.6



Annexes Fig 1. Relationship between $\delta^{15}\text{N}$ reference grass and $\delta^{15}\text{N}$ reference dicotyledons



Annexes Fig 2. Relationship between $\delta^{15}\text{N}$ reference plant in frame A and $\delta^{15}\text{N}$ reference plant in frame B