

INTENSIFICACIÓN SOSTENIBLE DE SISTEMAS GANADEROS CON LEGUMINOSAS: PLATAFORMA DE COOPERACIÓN LATINOAMERICANA Y DEL CARIBE

Producto 7. Publicaciones

Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno, gases de efecto invernadero, stock de carbono del suelo e impacto de la incorporación de leguminosas en la producción animal

Alejandro Oscar Costantini

Mercedes Busto

Franco Alexis González

2021





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido compilado por Alejandro Costantini (INTA, Argentina), Mercedes Busto y Franco González (Facultad de Agronomía, UBA), siendo sus capítulos elaborados por Fernando Lattanzi (INIA, Uruguay), Bruno Alves (Embrapa, Brasil), Francisco Salazar, Marta Alfaro, Sara Hube, Camila Muñoz y Emilio Ungerfeld (INIA, Chile), Adriana Rodríguez y Elizabeth Jacobo (Facultad Agronomía. UBA, Argentina).

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org





Contenido

Introducción.....	4
Fijación biológica de nitrógeno (FBN).....	5
Evaluación de emisiones de GEI (N ₂ O y CH ₄) desde el suelo	8
Protocolo para determinación de emisiones de metano	13
Impacto de la incorporación de leguminosas en la pastura sobre la productividad animal.....	15
Evaluación del stock de carbono del suelo	18
Recomendaciones Generales para el trabajo a campo	22
Referencias Bibliográficas	23
Instituciones participantes	24



Introducción

El presente material ha sido generado como un insumo fundamental para el desarrollo del Proyecto “Intensificación sostenible de sistemas ganaderos con leguminosas: plataforma de cooperación Latinoamericana y del Caribe” financiado por FONTAGRO, el Ministerio de Industrias Primarias y Procisur, y que reúne la participación de 8 países de la mencionada región, a saber: Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Ecuador, Nicaragua y República Dominicana.

Dada la diversidad de metodologías propuestas en la bibliografía internacional y su diferente grado de adopción según usos, costumbres y disponibilidad / accesibilidad de materiales, es que los integrantes del grupo de investigadores que componen este proyecto convinieron en la necesidad de unificar las metodologías a ser utilizadas en una guía que sirviera de orientación para los grupos y permitiera la comparación de resultados obtenidos en diferentes regiones.

Esta diversidad se presenta también en las situaciones de estudio, que pueden ir desde áreas de producción extensiva hasta superficies experimentales bien menores en lo que hace a superficie, por lo que se ha convenido también que se presenten diseños estadísticos básicos que puedan ser utilizados en una gama amplia de situaciones. Ello es también fundamental no sólo a la hora de la comparación de resultados entre países, sino también para su rigurosidad científica y confiabilidad de la información obtenida.

Cada capítulo de esta guía ha sido redactado por el grupo responsable de cada actividad del denominado Componente 2 del Proyecto ATN/RF-16926-RG. FONTAGRO - PROCISUR, cuyo liderazgo corresponde a Uruguay en el tema Fijación Biológica de Nitrógeno, a Brasil en Secuestro de carbono, a Chile en Emisiones de gases de efecto invernadero y a la Argentina en Impacto sobre la productividad animal.

Los investigadores que conformamos este proyecto creemos que este material no es solamente un insumo importante para nuestras tareas específicas, sino también para otros grupos de investigación que deseen iniciarse en la temática. El material que se presenta es sintético, concreto en cuanto a conceptos, con bibliografía actualizada y con una buena cantidad de imágenes ilustrativas.

La Coordinación de este trabajo ha estado a cargo del Dr. Alejandro Costantini de INTA Argentina, con la colaboración del grupo de investigación del Instituto de Suelos de esa Institución y de los Lic. Mercedes Busto y Franco González, docentes de la Facultad de Agronomía de la UBA.

Dr. Alejandro Costantini
Líder proyecto. INTA. Argentina

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Instituciones Responsables: INIA-Uruguay, INIAP-Ecuador

Autor: Dr. Fernando A. Lattanzi (INIA – Uruguay)

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN) por parte de especies leguminosas se determina por medio del método de abundancia natural de los isótopos de nitrógeno (^{15}N y ^{14}N) estimándose la relación entre ambos ($\delta^{15}\text{N}$), según la metodología descrita por Högberg (1997).

Tipo de muestreo:

Muestreo extensivo y de alta intensidad espacial de pasturas puras de leguminosa y mezcla leguminosas/gramíneas de las regiones ganaderas del país (Fotografías 1 y 2). Se realiza en dos años consecutivos durante la estación de mayor crecimiento de la leguminosa (ej. primavera en climas templados y subtropicales húmedos, verano en climas tropicales con estación seca).



Fotografías 1 y 2: Pasturas de leguminosas y mixtas

Forma de toma de las muestras

Se muestrea una alta cantidad de sitios dentro de las regiones principalmente ganaderas del país o región, de manera de obtener una buena representatividad del sitio en cuestión, incluyendo pasturas de diferentes edades, con diferentes especies leguminosas, y sobre diferentes tipos de suelos. Se prevé un mínimo de 50 sitios por región.

En cada sitio se toman dos muestras apareadas de la pastura, una con presencia y otra con ausencia de leguminosas, a una distancia menor a los 5 m, buscando reducir eventuales variaciones entre las muestras apareadas asociadas al suelo y al manejo (fertilización, pastoreo, cortes, cierres, etc.).

Se relevan variables de manejo a partir de la información brindada por cada productor (edad,



fertilización, especies sembradas, tipo de suelo).

Mediciones a realizar:

En cada sitio se cuantifica:

- (i) biomasa verde (kg MS ha⁻¹)
- (ii) concentración de nitrógeno total de la biomasa verde (%N = g N g MS⁻¹ x 100)
- (iii) estimación del índice de nutrición nitrogenada (INN) de esas pasturas y de sus componentes leguminosa y no leguminosa usando la curva de referencia de especies C3 o C4, según corresponda, siguiendo la metodología descrita por Gastal and Lemaire (2002)

$$INN = \% N_{\text{muestra}} / (4.8 * MS^{-0.32})$$

- (iv) relación de isótopos estables de nitrógeno ¹⁵N/¹⁴N (δ¹⁵N)
- (v) estimación de la proporción del nitrógeno derivado de fijación biológica (N_{fix}) (Högberg 1997):

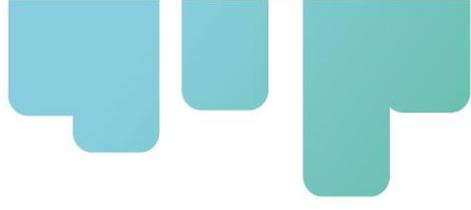
$$\%N_{\text{fix}} = 100 * (\delta^{15}N_{\text{especie no fijadora}} - \delta^{15}N_{\text{Leguminosa}}) / \delta^{15}N_{\text{especie no fijadora}} - \beta$$

- (vi) estimación de la eficiencia de FBN en kg N fijado por tt de materia seca de leguminosa:

$$N_{\text{fix}} / \text{tt MS leguminosa} = \%N_{\text{fix}} * \% \text{ N de la leguminosa}$$

donde B es el δ¹⁵N de una leguminosa solo con acceso a nitrógeno atmosférico y δ¹⁵N_{especie no fijadora} es el δ¹⁵N de especies gramíneas presente en la pastura. Estas tres variables se miden en muestras cosechadas en varios marcos de 34 x 50 cm en los que se separan las leguminosas-objetivo del resto de las especies (usualmente, gramíneas). El valor δ¹⁵N_{especie no fijadora} se mide en material de especies gramíneas presentes en la pastura. El valor B se determina según Unkovich et al. (2008).

- (vii) Evolución temporal del NDVI de la pastura muestreada usando el *dataset* de la plataforma satelital SENTINEL de la *European Space Agency* accedido a través de la herramienta Google Engine.
- (viii) Asociado a cada muestreo de pastura se obtienen dos muestras de suelo (0-3 cm y 0-15 cm) en las que se determinan:
 - a. pH

- 
- b. fósforo disponible (ppm)
 - c. potasio intercambiable ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ suelo)
 - d. carbono orgánico (g C kg^{-1} suelo)
 - e. conductividad eléctrica sobre el extracto de saturación de las muestras de suelo
 - f. relación de adsorción de sodio (RAS)

Finalmente, las variables climáticas precipitación, temperatura del suelo y radiación se derivan de los productos de NASA/POWER (NASA *Prediction Of Worldwide Energy Resources*; <https://power.larc.nasa.gov/>).

Análisis estadístico:

Para el análisis de los datos se usan herramientas de carácter descriptivas, como cuadros de frecuencia e histogramas. La influencia de las diferentes variables auxiliares de suelo, de clima y del estado de la leguminosa en el nivel de FBN se evalúa inicialmente utilizando matrices de correlación simples, y modelos de regresión lineal múltiple.

Para algunas variables de especial interés se compara el valor de cada variable auxiliar para el percentil 15 vs. 85 de las variables respuesta a través de una prueba-*t*, y se exploran funciones de frontera para ver el grado de limitación dado por el factor evaluado.

Para cada región se realizan semivariogramas para evaluar la correlación espacial existente, y eventualmente, se realizan interpolaciones (*kriging*) y se elaboran mapas.

Resultados esperados:

Mapa del funcionamiento (=variabilidad) de la FBN en las principales forrajeras utilizadas en sistemas de producción de forraje de la región bajo estudio, y datos que permitan llevar adelante (1) un primer análisis de posibles causas de dicha variabilidad asociadas a factores de química de suelo, y (2) un primer análisis de posibles consecuencias productivas de dicha variabilidad (estimada como diferencias en INN y en niveles medios anuales de NDVI).

Evaluación de emisiones de GEI (N₂O y CH₄) desde el suelo

Instituciones Responsables: INIA-Chile, INIAF-Rep. Dominicana

Autores: Dres. Marta Alfaro, Francisco Salazar y Sara Hube (INIA – Chile)

Las emisiones de óxido nitroso (N₂O) y metano (CH₄) desde el suelo se determinan por medio del uso de cámaras estáticas (Fotografías 3 y 4), según la metodología descrita por De Klein y Harvey (2015).



Fotografías 3 y 4: Cámaras estáticas.

Colecta de muestras de gas:

- Muestreo una vez al día, 10-13 hs (cada país definirá el momento más representativo según curva de emisión diaria de N₂O).
- Uso de viales al vacío previamente etiquetados/identificados.
- Se colecta una muestra de aire atmosférico previo al inicio de colecta de muestras de las cámaras.
- Se colectan muestras con sobre-presión (30 mL en viales de 22 mL, 10 mL en viales de 6 mL, 15 mL en viales de 10 mL, etc).
- Las muestras se colectan en períodos fijos en cámaras (tiempo de muestreo entre cámaras, por ejemplo 1 min).
- Se utiliza una jeringa por cámara.
- Previa colecta de la muestra final en cada cámara se debe mezclar el aire de la parte aérea de la cámara (dos veces).
- Muestreo en tiempos: 0, 20 y 40 minutos luego de colocar la cámara sobre el suelo. Pueden emplearse rangos de tiempos menores o mayores, según las concentraciones



acumuladas por tiempo. En cualquier caso, debe asegurarse un periodo de acumulación lineal al interior de la cámara.

- Al finalizar el muestreo de cada fecha se debe retirar las tapas de las cámaras.
- Se realiza una medición de gases antes de aplicar los tratamientos (previo a aplicación), esto permite tener una estimación de la variabilidad espacial en el sitio del experimento además de brindar una idea de la variabilidad de los valores basales (ej. Ambientales).
- Las muestras se equilibran a presión ambiente previo análisis (con una aguja en un vaso con agua).

Muestreo post aplicación de tratamientos:

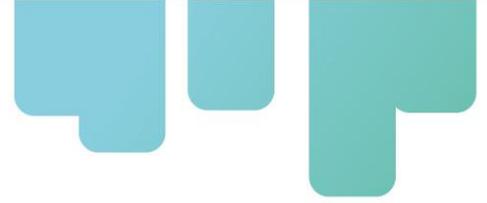
- La frecuencia de muestreo debe organizarse según el objetivo del experimento. Para Factores de Emisión, la frecuencia sugerida es:
 - Primera semana: el primero de estos muestreos se realiza el mismo día de aplicación de tratamientos, inmediatamente después, luego se realizan 3 muestreos al día 1, 3 y 7 post-aplicación.
 - Segunda semana: 3 veces/semana.
 - Tercera a quinta semana: 2 veces/semana.
 - Sexta semana hasta nivel basal: 1 vez a la semana.
- Además, se debe contabilizar por los eventos de lluvia, de manera que se tiene que muestrear durante 2 o 3 días posteriores a un evento mayor a la precipitación/riego crítico de cada situación climática (por ejemplo, 10 mm en sistemas templados del sur de Chile).
- Cuando sea posible, y para cada fecha de muestreo, se debe de tomar un muestreo para control de linealidad, esto es, muestras en una cámara por tratamiento a los 0, 20, 40 y 60 min para verificación de aumento lineal de concentración de N_2O en el tiempo.

Factores externos a considerar:

- Descripción del sitio experimental: latitud, longitud, tipo de suelo, textura, tipo de pradera, uso de suelo previo.
- Registro de variables climáticas: precipitación y temperatura del aire/día (estación meteorológica).

Otros muestreos a realizar:

- Aire, una por fecha de muestreo, para registro de nivel atmosférico.
- Temperatura al interior y exterior de la cámara durante el muestreo.
- Humedad y temperatura de suelo (0-10 cm) por día de muestreo (utilización de sensores).
- Previo a la aplicación de los tratamientos, el suelo de cada parcela se muestrea a una profundidad de 0 a 10 cm, para determinar carbono orgánico total ($g\ kg^{-1}$), pH, densidad aparente, NO_3^- y NH_4^+ . Durante el período experimental los muestreos de suelo se realizan una vez en la semana a la misma profundidad para determinación de NO_3^- y NH_4^+ . Se pueden considerar mayores profundidades dependiendo del sistema radicular de las praderas consideradas, pero se debe contar con el dato de 0-10 cm.



- Rendimiento y contenido de N en la pradera, según lo requiera su crecimiento. Corte y análisis por parcela.
- En caso de almacenaje de muestras previo análisis en cromatografía gaseosa, se toma al menos una muestra de un estándar conocido que es almacenado y analizado bajo las mismas condiciones de las muestras recolectadas, como sistema interno de control de calidad.

Gases a analizar y reportar por cromatografía gaseosa:

- N₂O, CH₄, CO₂. Este último para chequeo de funcionamiento adecuado de cámaras de acumulación. El análisis de los datos de GEI obtenidos se realiza usando la metodología propuesta por Venterea et al. (2015). Las emisiones instantáneas son correlacionadas con parámetros climáticos y de suelo medidas. Los datos de producción, calidad del cultivo y de emisiones de GEI son analizados vía análisis de varianza y comparación de medias empleando el software estadístico a definir por cada país.

Almacenaje de muestras:

- De ser necesario el almacenaje de muestras, éstas se mantienen a temperatura ambiente, bajo condiciones de oscuridad y evitando fluctuaciones de temperatura.

Colecta de orina bovina:

- Ubicar a las vacas en cepo o similar o en antesala del tambo para el caso de bovinos lecheros.
- Estimular manualmente la vulva y colocar una jarra plástica para colectar la orina.
- Traspasar la orina colectada a un recipiente grande (en donde se acumularán todas las orinas) y homogeneizar lo colectado del mismo tratamiento a evaluar.
- Una vez recolectados los litros de orina necesarios tomar tres muestras de orina de 100 ml, agregar 5 ml de ácido sulfúrico (al 5%) a cada una, para inmovilizar el nitrógeno, identificarlas y poner en frío para análisis de nitrógeno total por metodología de Kiejdhal.
- Guardar en el freezer al menos una contra muestra como respaldo.
- Traspasar la orina a botellas/envases plásticos y aplicar dentro de las cámaras instaladas en el campo cubriendo toda la superficie.
- Aplicar orina en la parcela contigua a la cámara en superficie equivalente a la de la cámara para evaluar el impacto productivo de la aplicación. Lo ideal es aplicar la orina lo más pronto que se pueda luego de la colecta, evitando su almacenaje.

Seguridad:

- El manejo de agujas debe realizarse con cuidado y calma.
- Al insertar agujas en septas, éstas deben afirmarse desde su base para evitar torceduras y pinchazos.
- Es conveniente arrodillarse al realizar cada muestreo, para de esa manera evitar problemas lumbares.



- Es conveniente contar con un botiquín de primeros auxilios básico en campo.
- Las agujas dadas de baja deben almacenarse en contenedor impermeable cerrado (no bolsas), e idealmente con su cubre puntas hasta disposición final.

Diseño experimental:

Se sugiere bloques completos al azar, con 4 o 5 repeticiones.

Tratamientos mínimos requeridos a implementar:

- i) Control (sin orina)
- ii) Orina bovina de animales consumiendo pradera de leguminosas
- iii) Orina bovina de animales consumiendo pradera sin leguminosas

Los países podrán incorporar otros tratamientos que sean relevantes a sus circunstancias nacionales, pero el set de tratamientos mínimos debe ser considerado. El tratamiento sin orina tiene por objetivo poder emplear los resultados de esta evaluación para la generación de factores de emisión. Si este no es el objetivo en un país específico, pudiera obviarse.

Para ensayos de campo:

- Tamaño de parcelas: al menos 2 x 1 m (2m²).
- Cámaras de gases: como mínimo 1 por parcela (PVC o acero inoxidable).
- Aplicación de tratamientos a parcelas y cámaras previo corte de homogenización.
- Muestreo diferenciado en la parcela (sector para análisis destructivos, sector para determinación de gases -> cámaras) según el siguiente diagrama:



Para ensayos bajo condiciones controladas se sugiere la metodología descrita por Alfaro et al. (2018). En breve, se utilizan minilísimetros de PVC de 20 cm (Fotografía 5). Que en su interior tienen bloques intactos de suelo (0-15 cm) con pradera en su parte superior. Los lísimetros son mantenidos bajo condiciones de humedad contante y a temperatura controlada (ej. 20°C). En la pradera al interior de los minilísimetros se aplican los distintos tratamientos a evaluar, sugiriéndose el uso de 4 repeticiones y en un diseño de bloques completamente al azar. Sobre los lísimetros son instalados cámaras dinámicas para medición de amoníaco y para óxido nitroso se utilizan cámaras estáticas (Fotografía 6).



Fotografía 5: Minilímetros de PVC de 20 cm.



Fotografía 6: Cámaras estáticas para medición de N_2O .

Protocolo para determinación de emisiones de metano (CH₄) entérico en vacas lecheras

Instituciones Responsables: INIA-Chile, INIAF-Rep. Dominicana
Autores: Dres. Camila Muñoz y Emilio M. Ungerfeld (INIA – Chile)

Técnica de medición de emisión de CH₄:

La producción de CH₄ es evaluada por 6 días utilizando la técnica del hexafluoruro de azufre (SF₆) (Muñoz et al., 2019). Brevemente, las vacas recibirán por vía oral un tubo de permeación con gas SF₆ con una tasa de permeación previamente determinada. Diariamente, una muestra continua de los gases espirados y eructados será recolectada en forma individual por animal en contenedores de PVC al vacío (Fotografía 7), también se colectarán muestras de gases ambientales durante el periodo de medición. La concentración de gases metano y SF₆ contenido en los collares será determinada utilizando cromatografía gaseosa. La producción de metano será calculada a partir de esta información. Además, muestras de alimentos ofrecidos y rechazados, orina, fecas, y leche son tomadas y analizadas para determinar valor nutricional, calcular digestibilidad de la dieta, energía metabolizable, balance y eficiencia de utilización de nitrógeno. Los datos son analizados como *crossover* incluyendo los efectos fijos del tratamiento y periodo y el efecto aleatorio de la vaca.



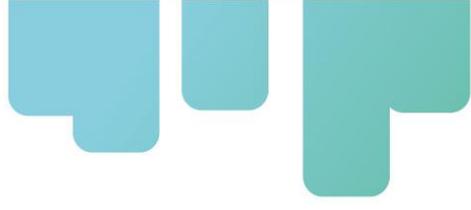
Fotografía 7: Técnica de medición de CH₄ entérico en vacas bajo pastoreo.



Se cuantifican variables productivas (de forraje y producción animal), las emisiones de CH₄ entérico y el consumo animal individual. Las emisiones de metano se expresarán como g CH₄ d⁻¹ y g CH₄ kg⁻¹ MS consumida.

Diseño experimental:

Para este experimento se utilizarán como mínimo 8 vacas multíparas en lactación media en un experimento con un diseño experimental *crossover* con 2 tratamientos y 2 periodos, de 4 semanas cada uno (3 semanas de adaptación a la dieta y 1 semana de mediciones). Los tratamientos consisten en el reemplazo de heno de gramínea (por ejemplo, ballica o ryegrass) por heno de leguminosa (por ejemplo, alfalfa) en la dieta de las vacas en lactancia media. Así, la dieta control consiste en 7 kg de materia seca (MS) de heno de gramínea, 6 kg MS de ensilaje de pastura y 4 kg MS de concentrado. La dieta con leguminosa es similar, pero se reemplaza el heno de gramínea con 7 kg MS de heno de leguminosa. Las vacas son evaluadas estabuladas individualmente, donde se ordeñan 2 veces por día. Durante la semana de medición de cada periodo se determina la ingesta y rechazo de alimentos, y se realiza colección total de fecas y orina.



Impacto de la incorporación de leguminosas en la pastura sobre la productividad animal

Instituciones Responsables: INTA-Argentina, INIA-Uruguay, IPTA-Paraguay

Autoras: Dras. Elizabeth Jacobo y Adriana Rodríguez. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires

Protocolo de toma de muestras y alternativa de diseños estadísticos:

Objetivo: Cuantificar el impacto de la incorporación de leguminosas en la pastura en la productividad animal.

A. En sistemas de producción de carne vacuna:

Los sistemas de producción de carne vacuna se componen en general, de dos etapas: 1) la cría de terneros hasta el destete, usando como principal fuente de alimentación los pastizales naturales, y 2) la recría de los terneros y posterior engorde o terminación hasta el peso de faena, cuya fuente de alimentación son recursos forrajeros cultivados como pasturas polifíticas, verdeos, forraje conservado, granos y suplementos, en combinaciones variables según el grado de intensificación del sistema. Por lo tanto, cuantificar el impacto de la incorporación de leguminosas en la productividad animal requiere evaluar cada una de las etapas de la producción de carne. Se debe evaluar el impacto de la promoción o incorporación de leguminosas en pastizales naturales sobre la productividad secundaria de los sistemas de cría vacuna, como así también en sistemas dedicados a la recría y engorde. Para ello se debe evaluar la productividad primaria neta aérea, el consumo animal y la digestibilidad del forraje, permitiendo estimar la producción animal según la distinta contribución de leguminosas en los pastizales y en las pasturas.

A.1) Cría vacuna y pastizales

Diseño estadístico:

Dado que el pastoreo rotativo incrementa la contribución de leguminosas del pastizal (Jacobó et al. 2006), se deben seleccionar al menos tres establecimientos ganaderos dedicados a la cría vacuna en los cuales se aplique manejo rotativo del pastoreo, y al menos otros tres establecimientos que apliquen pastoreo continuo. En cada uno de los establecimientos se selecciona un lote de pastizal natural sobre suelos que correspondan a la misma serie en todos los establecimientos.

Protocolo de toma de muestras:

Se evalúa la productividad primaria neta aérea anual y su patrón estacional, así como el consumo animal, a partir de cosechas sucesivas de biomasa.

En cada lote (repetición) se colocan 10 jaulas de 1m x 1m. En los establecimientos que aplican



pastoreo rotativo, al finalizar el período de ocupación se cosecha la biomasa acumulada dentro de cada jaula desde el inicio del periodo de descanso. Se toman dos muestras de 0,5 x 0,5 m por jaula, una muestra se corta al ras para estimar productividad y la otra muestra se corta a una altura similar al remanente fuera de la jaula para estimar el consumo. En los establecimientos que aplican pastoreo continuo se aplica el mismo procedimiento y los mismos períodos de acumulación de biomasa dentro de las jaulas que el de los establecimientos con pastoreo rotativo. Las jaulas se cambian de ubicación dentro de cada lote luego de cada cosecha.

La biomasa cosechada se separa en al menos dos componentes: pastos y leguminosas, se seca en estufa a 65 ° C durante 48 hs o hasta alcanzar peso constante, y posteriormente se pesa.

Se estima la digestibilidad aparente (DMS) de las muestras de biomasa cortadas para estimar el consumo aplicando la ecuación sumativa de Goering y Van Soest (1970), para lo cual se deben determinar las concentraciones de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina y cenizas (Van Soest et al. 1991); y la concentración de proteína cruda (CP), multiplicando el nitrógeno obtenido por Kjeldahl por 6,25 (AOAC, 1984).

A.2) Recría y engorde en pasturas polifíticas

Diseño estadístico:

Se deben seleccionar al menos seis establecimientos ganaderos dedicados a la recría y engorde vacuno con distinta composición, con al menos un 50% de base pastoril, que difieran en la proporción de leguminosas que incluyen en las pasturas, y que apliquen pastoreo rotativo con criterios similares entre sí. Se identifica un lote en cada establecimiento que corresponda a la misma serie de suelo, y que la pastura haya sido sembrada en el mismo año.

Protocolo de toma de muestras:

Se evalúa la productividad primaria neta aérea anual y su patrón estacional, así como el consumo animal, a partir de cosechas sucesivas de biomasa. En cada lote (repetición) se colocan 10 jaulas de 1m x 1m. Al finalizar el periodo de ocupación se cosecha la biomasa acumulada dentro de cada jaula desde el inicio del periodo de descanso. Se toman dos muestras de 0.5 x 0.5 m por jaula, una muestra se corta al ras para estimar productividad y la otra muestra se corta a una altura similar al remanente fuera de la jaula para estimar el consumo.

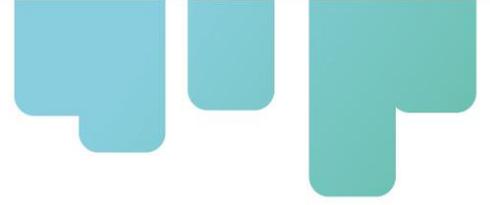
La biomasa cosechada se separa en al menos dos componentes: pastos y leguminosas, se seca en estufa a 65 ° C durante 48 hs o hasta alcanzar peso constante, y posteriormente se pesa.

Se estima la digestibilidad aparente (DMS) de las muestras de biomasa cortadas para estimar el consumo aplicando la ecuación sumativa de Goering y Van Soest (1970), para lo cual se deben determinar las concentraciones de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina y cenizas (Van Soest et al. 1991); y la concentración de proteína cruda (CP), multiplicando el nitrógeno obtenido por Kjeldahl por 6.25 (AOAC 1984).



B. En sistemas de producción de leche

Se evalúa el impacto de la incorporación de leguminosas en sistemas de producción de leche seleccionando al menos diez establecimientos con distinta proporción de dieta pastoril. En cada establecimiento se releva la superficie y composición de cada recurso forrajero utilizado para las vacas en ordeño, así como la composición de la dieta no pastoril, suministrada durante los últimos dos años y se debe relacionar con los registros de producción de leche diarios. Por diferencia entre la dieta pastoril y no pastoril se determinará la producción de leche que proviene del consumo de forraje por pastoreo directo, la que se relaciona con la proporción de leguminosas relevada en los recursos forrajeros en cada establecimiento.



Evaluación del stock de carbono del suelo

Instituciones Responsables: EMBRAPA-Brasil, INTA-Nicaragua

Autor: Dr. Bruno J. R. Alves (Embrapa – Brasil)

Los muestreos pueden ser realizados en experimentos de largo plazo (con parcelas y diseños experimentales) o en cronosecuencias, siempre que exista una pastura con y sin asociación con leguminosas y se conozcan bien sus datos históricos. Es preferible tener en la crono secuencia varias situaciones en cuanto a cantidad de años de consorcio gramínea – leguminosa. La existencia de un área lo menos alterada posible y representativa de la condición original es también muy deseable y de mucho valor para estos estudios. Para conocer los datos de las crono secuencias es importante que se hagan consultas a propietarios o responsables de los establecimientos, acerca del manejo del área y todo aquello que hace a su historia de uso. Las imágenes de satélite a lo largo de los años son excelentes herramientas para reconstruir la historia de uso. La evaluación de uniformización entre áreas en lo que hace al tipo de suelo, espesor de los horizontes, densidad debajo de los 40 cm, textura de los horizontes y si fuera posible, la distribución del ^{13}C en el perfil del suelo, son medidas muy importantes para determinar la calidad de la crono secuencia que va a ser utilizada.

En cada unidad de muestreo (bosque o área lo más inalterada posible, pastura o pastizal de gramíneas con y sin asociación con leguminosas), y en cada una de las situaciones de antigüedad a estudiar, se abren calicatas (Fotografía 8) cuyo número será decidido en función del grado de heterogeneidad de área, sugiriéndose para la mayoría de las situaciones entre 2 y 3, y de ellas se toman muestras de suelo. Idealmente en las profundidades 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-80, 80-100 cm, o hasta que se encuentre la capa freática u otro impedimento (ej. duripan). Si bien se considera esta la situación ideal, en caso de que la logística se complique o el número de muestras se vuelva demasiado elevado podrían disminuirse estos estratos, tomando solamente los 3 primeros, que es la profundidad mínima indicada por el IPCC. Si se percibiera abundancia de raíces por debajo de los 30 cm debería profundizarse un poco más hasta disminución importante de su presencia.



Fotografía 8: Calicata para la toma de muestras de suelo.

En tres paredes de la calicata se toman muestras de suelo deformadas y también se obtienen otras no alteradas (de paredes opuestas de la calicata) utilizando anillos de metal con volumen interno conocido (anillos de Kopeck), con el fin de determinar densidad aparente del suelo. Alrededor de las calicatas, en un radio de 5 a 10 m, otros cuatro puntos de muestreo deben ser incluidos, pero sólo con uso del barreno, y en las profundidades de 0-10, 10-20 y 20-30 cm, donde se esperan los cambios más importantes.

Después de la toma e identificación de las muestras, ellas deben ser secadas al aire, desterronadas y tamizadas en tamiz con malla de 2 mm. Deben tomarse cuidados especiales en el muestreo de las capas superficiales del suelo, evitando al máximo la inclusión de raíces finas visibles en la muestra, cuyos contenidos de C y N no forman parte de los compuestos orgánicos coloidales estables de la materia orgánica del suelo, pudiendo conducir a errores en la interpretación de la acumulación de C y N en el perfil del suelo. Otro aspecto que debe observarse es si el área recibió aplicación de cal y/o si existe una cantidad significativa de carbonato de calcio. Se recomienda que antes de la determinación de C orgánico total, que las muestras sean evaluadas en cuanto a la reactividad de los carbonatos minerales (CaCO_3 y MgCO_3) en medio ácido, como un indicativo de cantidades perceptibles de éstos a punto de influir en el resultado final del análisis de carbono orgánico total (se detecta frente a la adicción gradual de gotas de HCl 1M, lo que induce a una efervescencia). En caso de reacción positiva se debe proceder a un tratamiento de destrucción de carbonatos.

En las muestras tamizadas se analiza la textura, algunas variables químicas atendiendo a particularidades locales de los suelos y los contenidos de C y N. Para la exactitud en las determinaciones de C y N totales en las muestras de suelo y para fines de uniformidad metodológica, es esencial que todas las muestras sean analizadas a través del método de



oxidación seca, empleando equipo auto-analizador de C y N total. Para facilitar y aumentar la calidad de los análisis, las muestras deben ser molidas finamente, lo que se consigue utilizando un molino de rodillos, atendiendo a las exigencias de los equipos de análisis.

Los diferentes manejos adoptados en las áreas dentro de cada cronosecuencia pueden resultar en diferencias entre las densidades del suelo. Sin embargo, la comparación entre las áreas de los tratamientos en estudio, dentro de un determinado sitio experimental, deben ser realizada en base a la misma masa de suelo del perfil del tratamiento de referencia, o sea, toda la comparación se realiza respecto de la misma masa de suelo. Este procedimiento asume que la compactación resultante de las operaciones mecánicas afecta más significativamente a las capas superficiales del perfil del suelo. Así, para ajustarse al perfil de suelo del sistema referencia, los contenidos de C y N en los perfiles de suelo de los sistemas agrícolas se calculan restando de la capa más profunda (80-100 cm) el contenido de C y N totales acumulados en la masa extra de suelo de esta profundidad. Se debe destacar que siempre se debe respetar la masa de suelo del perfil del sistema de referencia.

Esta corrección fue calculada matemáticamente, expresándose a través de siguiente ecuación:

$$C_S = \sum_{i=1}^{n-1} C_{Ti} + \left[M_{Tn} - \left(\sum_{i=1}^n M_{Ti} - \sum_{i=1}^n M_{Si} \right) \right] C_{Tn}$$

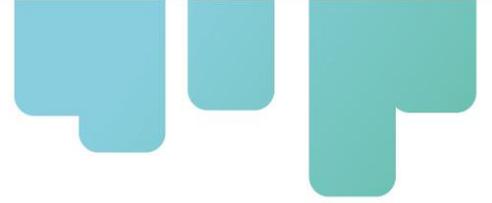
Donde, C_S es la acumulación (stock) de C (Mg C ha^{-1}) en el suelo en una profundidad donde la masa de suelo sea la misma de aquella observada en el perfil de suelo utilizado como referencia;

$\sum_{i=1}^{n-1} C_{Ti}$ es la suma del contenido de C total (Mg ha^{-1}) desde la capa 1 (superficie) hasta la capa 'n-1' (penúltima) en el perfil del suelo bajo el tratamiento;

$\sum_{i=1}^n M_{Si}$ es la suma de la masa de suelo (Mg ha^{-1}) desde la capa 1 (superficie) hasta la cama 'n' (última capa) en el perfil del suelo referencia;

$\sum_{i=1}^n M_{Ti}$ es la suma de la masa de suelo (Mg ha^{-1}) desde la capa 1 (superficie) a la capa 'n' (última capa) del perfil del tratamiento y M_{Tn} y C_{Tn} son respectivamente la masa de suelo y concentración de carbono en la última capa del perfil del suelo bajo el sistema en evaluación.

Los factores de manejo de los pastos deben calcularse de acuerdo con la metodología propuesta por el IPCC (IPCC, 2006). Esta metodología se basa en la integración del contenido de carbono del suelo en los primeros 30 cm después del cambio de manejo. Lo mismo debe realizarse hasta las profundidades alcanzadas en cada región teniendo los 100 cm como el factor anual de cambio del stock de C del suelo se calcula por la razón entre el stock de C del suelo bajo la pradera sin, o

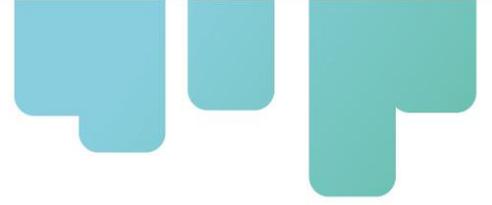


con leguminosa, y el stock del suelo bajo vegetación nativa (los datos de bosques son considerados como referencia para los cálculos de los factores en las regiones tropicales).

Los suelos minerales constituyen un depósito de carbono que se ve influenciado por las actividades de uso y manejo de la tierra. El uso de la tierra puede tener un efecto de magnitud sobre el tamaño de este depósito mediante actividades como la conversión de tierras forestales en pastizales, por la que se puede perder un porcentaje de las existencias originales de C edáfico. El factor anual de cambio del stock de C del suelo se calcula por la razón entre el stock de C del suelo bajo la pradera sin, o con leguminosa, y el stock del suelo bajo vegetación nativa (los datos de bosque son considerados como referencia para los cálculos de los factores en las regiones tropicales, siendo que otras regiones deberán considerar la vegetación que sea pertinente a sus sistemas originales).

Según el IPCC, los factores de cambio de las existencias se definen a grandes rasgos e incluyen: 1) un factor de uso de la tierra (FLU) que refleja los cambios en las existencias de C relacionados con el tipo de uso de la tierra, 2) un factor de manejo (FM) que representa la principal práctica de gestión específica del sector de uso de la tierra (por ejemplo, diferentes prácticas de labores en tierras de cultivo), y 3) un factor de aporte (FI) que representa los distintos niveles de aporte de C al suelo.

Dado que la propuesta es estimar un factor de cambio de los stocks de C en el suelo, en la práctica ello sería el producto de FLU, FM y FI. El producto de esos tres factores es una fracción que se multiplicará por el stock original de C del suelo. De esta manera se obtiene la estimación de la reducción de las existencias de carbono sobre la condición nativa o aquella más próxima a esa situación, tomada como línea de base.

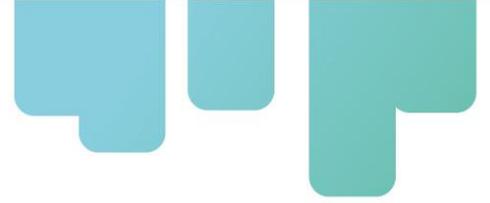


Recomendaciones Generales para el trabajo a campo

Aunque en algunos casos ya fue mencionado debe tenerse muy en cuenta algunas medidas mínimas de seguridad para la realización de los muestreos a campo:

1. Tener un recipiente adecuadamente acondicionado en caso de utilizar material de descarte.
2. En caso de tormenta eléctrica retirarse inmediatamente del campo. Hasta tanto se consiga eso, nunca colocarse debajo de los árboles y el vehículo puede ser el lugar más seguro.
3. Llevar un botiquín de primeros auxilios, repelente de insectos y agua potable para el grupo de trabajo.
4. Vestir ropa adecuada para el trabajo. Las prendas de mangas cortas no son las mejores, aún en situaciones en que pueda hacer mucho calor.

En áreas con presencia frecuente de animales ponzoñosos llevar la protección adecuada para trabajar en el campo. No levantar, o hacerlo con mucho cuidado si fuera necesario, troncos o piedras.



Referencias Bibliográficas

- Alfaro, M., Salazar, F., Hube, S., Ramírez, L. & Mora, M. (2018). "Ammonia and nitrous oxide emissions as affected by nitrification and urease inhibitors". *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 18(2), 479-486.
- AOAC. (1984). "Official Methods of Analysis". *Association of Official Analytical Chemists*. 14th Edition, AOAC, Arlington.
- De Klein, C. & Harvey, H. (2015). "Nitrous Oxide Chamber Methodology Guidelines, Version 1.1". *Ministry for Primary Industries*, Wellington (New Zealand). 146p.
- Gastal F. & Lemaire G. (2002). "N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective". *Journal of Experimental Botany*. 53, 789-799.
- Goering HK & van Soest PJ. (1970). "Forage fiber analysis". *Agriculture Handbook No. 379*. Agricultural Research Service. US Department of Agriculture.
- Högberg P. (1997). "¹⁵N natural abundance in soil-plant systems". *New Phytologist*. 137, 179-203.
- IPCC. (2006). "Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories".
- Eggleston, H S, Buendia, L, Miwa, K, Ngara, T, & Tanabe, K. (2006). "IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories". Japan.
- Jacobo, E. J., Rodríguez, A. M., Bartoloni, N. & Deregibus, V. A. (2006). "Rotational Grazing Effects on Rangeland Vegetation at a Farm Scale". *Rangeland Ecology & Management*. 59 (3), 249-257pp. ISSN 1550-7424, <https://doi.org/10.2111/05-129R1.1>.
- Ledgard, S.F. (1989). "Factors affecting isotopic fractionation during nitrogen fixation by pasture legumes". In: Association Française pour la Production Fourragère (Editors). *Proc. XVI Int. Grassland Congress*, I. Nice, INRA, France, pp. 123–126.
- Muñoz, C., R. Sánchez, A. M. T. Peralta, S. Espíndola, T. Yan, R. Morales & E. M. Ungerfeld. (2019). "Effects of feeding unprocessed oilseeds on methane emission, nitrogen utilization efficiency and milk fatty acid profile of lactating dairy cows". *Anim. Feed Sci. Technol.* 249,18-30 pp. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.015>.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. (1991). "Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition". *J. Dairy Sci.*, 74, 3583-3597 pp.
- Venterea, R.T., Parkin, T.B, Cardenas, L., Petersen, S.O. & Pedersen, A.R. (2015). "Data analysis considerations". In: De Klein, C. and Harvey, H. (Eds.) *Nitrous Oxide Chamber Methodology Guidelines, Version 1.1*. Ministry for Primary Industries, Wellington (New Zealand). pp. 95-121.

Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org



Uso de leguminosas en sistemas ganaderos de América Latina y el Caribe: plataforma de cooperación

Producto 7: Fijación biológica de nitrógeno por *Lotus tenuis* en la Pampa Deprimida

Mercedes Busto, Romina Romaniuk, Alejandro Costantini
2022



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Mercedes Busto, Romina Romaniuk y Alejandro Costantini

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

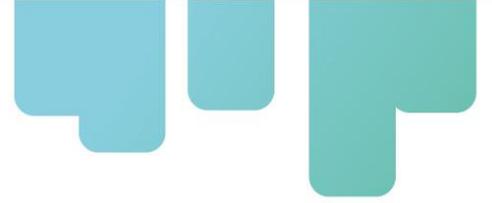
Palabras Clave: Fijación biológica de nitrógeno, <i>Lotus tenuis</i>, Pampa Deprimida.....	4
Introducción.....	5
Metodología de trabajo.....	6
Sitio de muestreo y diseño experimental a campo.....	6
Fijación biológica de nitrógeno.....	6
Cálculo de la proporción del N fijado.....	7
Muestreo de biomasa aérea a campo para determinar $\delta^{15}\text{N}_{\text{referencia}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{Lotus}}$, tMS y $\text{KgN}_{\text{fijado}}$.....	7
Muestreo de suelo y determinaciones analíticas generales.....	8
Estado de avance de la investigación	9
Referencias Bibliográficas.....	10
Instituciones participantes	13



Resumen

La Pampa Deprimida es una de las principales regiones ganaderas de la Argentina. En ella predominan los suelos hidro-halomórficos, donde el exceso de agua y/o sales en el pedón generan condiciones restrictivas para las especies que no poseen adaptaciones fisiológicas a dichas condiciones edáficas. Una de las especies forrajeras adaptadas a estos ambientes es *Lotus tenuis*, y se encuentra naturalizada en la Pampa Deprimida. Dentro de los beneficios aportados por *L. tenuis* a la pastura destaca el aporte de nitrógeno (N) al suelo a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). Uno de los objetivos abordados desde INTA-Argentina en el marco del proyecto es: cuantificar los aportes de N por FBN derivados de la incorporación de *L. tenuis* en pastizales de la Pampa Deprimida. Para ello, se han seleccionado situaciones de halomorfismo e hidromorfismo, en sistemas manejados con y sin la práctica de promoción de *L. tenuis*. En dichos ambientes se están realizando toma de muestras de vástago, de raíces y de suelo, con el fin de cuantificar el N fijado y otras variables relacionadas a la FBN.

Palabras Clave: Fijación biológica de nitrógeno, *Lotus tenuis*, Pampa Deprimida



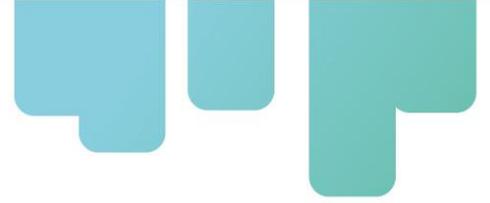
Introducción

La Pampa Deprimida es una de las principales regiones ganaderas de la Argentina, y se caracteriza por la actividad de cría (Otondo, 2018). El desarrollo de dicha actividad está asociada a sus características edáficas limitantes para los cultivos agrícolas de una gran parte de su superficie. En ella predominan los suelos hidro-halomórficos, donde el exceso de agua y/o sales en el pedón generan condiciones restrictivas para las especies que no poseen adaptaciones fisiológicas a dichas condiciones edáficas (Taboada et al., 2009; Bocchio et al., 2019). Una de las especies forrajeras adaptadas a estos ambientes es *Lotus tenuis*, leguminosa naturalizada en la Pampa Deprimida y originaria del Mediterráneo (Vignolio et al., 2016; Nieva, 2018).

L. tenuis se caracteriza por prosperar en ambientes marginales, por su valor nutricional similar a la alfalfa y al trébol blanco, la menor necesidad de fósforo con respecto a otras especies forrajeras de clima templado y por los aportes de nitrógeno (N) al suelo a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Vignolio et al., 2010; Escaray et al., 2012; Inostroza et al., 2015; Antonelli et al., 2016; Striker y Colmer, 2017; Espasandín et al., 2018).

La FBN es llevada a cabo por bacterias que se asocian simbióticamente a *L. tenuis*, a través de la formación de nódulos en sus raíces. Dichas bacterias reducen el N_2 a NH_4^+ , el cual es asimilado por la planta (Vicente et al., 2017); liberándose el N al suelo posteriormente a través de rizodeposiciones y del residuo vegetal. El N aportado a la matriz edáfica puede ser utilizado por las especies forrajeras que se desarrollan en el período invernal. Sin embargo, *L. tenuis* es una especie de lenta implantación, lo cual implica que, sin un manejo adecuado, su cobertura en el sistema sea menor a la deseada para la alimentación del ganado (Druille et al., 2017). Es por ello que se realiza la práctica de promoción, la cual consiste en disminuir la cobertura vegetal del suelo al final del período invernal, y con ello la competencia con otras especies por luz, agua y nutrientes, lo cual favorece el crecimiento de la leguminosa. Dicho sistema puede realizarse a través de la aplicación de herbicidas o mecánicamente a través del manejo de una alta carga animal temporal en los lotes que se quieren promover (INTA Chascomús, comunicación personal). Este tipo de manejo incrementa la biomasa de *L. tenuis*, lo cual está directamente relacionada con los aportes de N al sistema.

El estudio de la FBN asociada a *L. tenuis* es fundamental para evaluar la compensación de las pérdidas de N del sistema. Es por ello que uno de los objetivos abordados desde INTA-Argentina en el marco del proyecto es: cuantificar los aportes de nitrógeno por FBN derivados de la incorporación de *L. tenuis* en pastizales de la Pampa Deprimida.



Metodología de trabajo

Sitio de muestreo y diseño experimental a campo

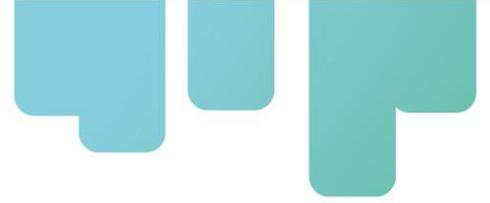
La investigación se está llevando a cabo en la Chacra Experimental Integrada Manantiales (Convenio INTA-MAIBA), que cuenta con 690 ha destinadas a la producción e investigación. Está ubicada a 19 Km al sur de la cabecera del partido de Chascomús en la provincia de Buenos Aires (35° 44' 52.44" S; 58° 02' 56.48 W), dentro de la región denominada Pampa Deprimida, la cual posee un clima templado húmedo, con una temperatura media anual de 15°C y precipitación media de 864 mm (Wermbter y Ramallo, 1980). Una de las características de esta extensa llanura es que no cuenta con una red de drenaje bien definida (Fucks et al., 2012); no obstante, ello, el área es lo suficientemente ondulada como para diferenciarse distintas posiciones dentro del paisaje que explican la existencia de lomadas planas, tendidos altos, intermedios y bajos, (Wermbter y Ramallo, 1980), lagunas, cubetas, cañadas y depresiones de escasa energía morfogenética (Vázquez et al., 2009). Los principales suelos pertenecen a los subgrupos Hapludol tapto árgico, Natracuol típico y Natracualf típico, representando el 30, 28 y 20% de la superficie total del lugar respectivamente; cubriendo un porcentaje inferior de superficie los Albacualfes mólicos y los Argiacuoles típicos (Wermbter y Ramallo, 1980). A su vez, la vegetación predominante de la región se caracteriza por los pastizales naturales. En los Hapludoles y Natracuoles dominan las praderas de mesófitas, en los Natracualfes las estepas de halófitas y en los Argiacuoles las praderas de hidrófitas y vegas de ciperáceas (Batista et al., 2005).

Para cumplir con el objetivo del trabajo, se cuenta con un experimento mensurativo con un diseño factorial. Los factores trabajados corresponden al ambiente edáfico (suelos hidromórficos y halomórficos) y al tipo de manejo (con y sin promoción de *L. tenuis*). Para cada combinación de los factores suelo x manejo se seleccionaron y clausuraron tres parcelas de 3 x 8 m (Tzanakakis et al., 2017), cada una de un lote distinto, constituyendo así tres réplicas por combinación de factores (12 lugares de muestreo totales dentro de la Chacra Experimental Manantiales).

Los muestreos se planificaron para las estaciones primavera, verano y otoño, dado que si bien *L. tenuis* es una especie perenne, su crecimiento es primavero estivo-otoñal y posee latencia invernal (Criado, 2014). Los datos que se están obteniendo a través de los muestreos se complementan con los registros meteorológicos de la estación meteorológica automática instalada dentro de la Chacra Experimental. Esta registra una serie de datos de importancia (temperatura del aire, temperatura del suelo, humedad relativa, punto de rocío y precipitación, entre otros) cada 10 minutos. Dichos datos serán recolectados del sitio web del Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico del INTA (<http://siga2.inta.gov.ar/>).

Fijación biológica de nitrógeno

Para evaluar la FBN se utilizará el método de la abundancia natural. Esta técnica permite cuantificar el porcentaje de N de las plantas de *L. tenuis* que proviene de la fijación biológica. Para



ello se debe determinar la proporción del isótopo de N^{15} en las plantas de *L. tenuis* y en al menos una especie de referencia; y la concentración de N^{15} de *L. tenuis* cuyo único medio de obtención de N es la atmósfera (denominado valor β , ver sección 4.1.3.2.). Para obtener los primeros valores mencionados se realizará un muestreo a campo, mientras que el último se obtendrá de bibliografía.

Cálculo de la proporción del N fijado

La proporción de nitrógeno de la biomasa aérea fijado (%Ndfa) se está calculando, acorde con Ledgard (1989), de la siguiente manera:

$$\%Ndfa = 100 * (\delta^{15}N_{referencia} - \delta^{15}N_{Lotus}) / (\delta^{15}N_{referencia} - \beta)$$

Donde $\delta^{15}N_{referencia}$ y $\delta^{15}N_{Lotus}$ representan la abundancia natural de N^{15} medido en la biomasa aérea de la planta de referencia y de *L. tenuis* respectivamente y β representa el valor de la abundancia natural de N^{15} en la biomasa de *L. tenuis* cuyo único medio para obtener N es el aire mediante la FBN. Debido a que se utilizaran dos plantas de referencia, se realizará el cálculo con cada planta de referencia y luego se promediará los valores de %Ndfa calculados con cada planta de referencia para obtener un valor final. Los valores de $\delta^{15}N_{referencia}$ y $\delta^{15}N_{Lotus}$ se obtendrán a través de análisis por espectrometría de masas de radio isotópico, tal como fue mencionado; mientras que el de β se obtendrá de bibliografía.

Con los datos obtenidos se calculará la cantidad de N fijado por hectárea de la siguiente manera (Landriscini et al., 2019):

Primero se calculará la cantidad de N fijado por tonelada de materia seca ($KgN_{fijado} \text{ tMS}_{Lt}^{-1}$):

$$KgN_{fijado} \text{ o } tMS_{Lt}^{-1} = \%Ndfa * \%N$$

Donde %N es el porcentaje de N total del vástago de *L. tenuis*.

Luego, con el valor de $KgN_{fijado} \text{ tMS}_{Lt}^{-1}$, se cuantificará la cantidad de N fijado por hectárea ($KgN_{fijado} \text{ ha}^{-1}$):

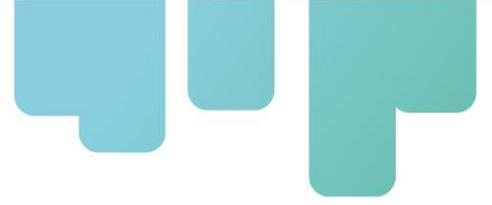
$$KgN_{fijado} \text{ ha}^{-1} = KgN_{fijado} \text{ tMS}_{Lt}^{-1} * tMS_{Lt} \text{ ha}^{-1}$$

Donde $tMS_{Lt} \text{ ha}^{-1}$ son las toneladas de materia seca de *L. tenuis* por hectárea.

A su vez se cuenta el número de nódulos activos (considerando como activos, aquellos con coloración rosada (Di Bella et al., 2019); y se mide la masa seca de nódulos activos ($Kg \text{ ha}^{-1}$) asociados a *L. tenuis*. Estos valores se contrastarán con los obtenidos de %Ndfa.

Muestreo de biomasa aérea a campo para determinar $\delta^{15}N_{referencia}$ y $\delta^{15}N_{Lotus}$, tMS y KgN_{fijado}

En cada parcela se seleccionaron 3 subparcelas al azar de $1m^2$ (Orduz Rodríguez et al., 2011) con



el fin de realizar los muestreos de vástagos para medir N^{15} , biomasa aérea y de nódulos (para evaluar si ellos se encuentran activos o no al momento de realizar el muestreo), y para calcular el porcentaje de cobertura de *L. tenuis*. El muestreo se repetirá dos veces en primavera, en verano y en otoño durante dos estaciones de crecimiento (años 2021, 2022 y 2023). Luego se cosecha la biomasa aérea de las plantas de *L. tenuis* a la altura de la corona de la planta. Como sugiere Unkovich et al. (2008) se utilizan dos plantas de referencia con el fin de disminuir el error atribuido a las diferencias fisiológicas existentes entre *L. tenuis* y la planta de referencia. Dichas especies de referencia seleccionadas para el ensayo serán *Ambrosia tenuifolia* y *Coniza bonariensis*. Ambas se tratan de especies no leguminosas, que comparten la misma estación de crecimiento con *L. tenuis* y cuya exploración radical en profundidad es similar al de la fabácea. Esto permite que las tres especies seleccionadas sean comparables entre sí en lo que hace a la toma de N^{15} del suelo. Una vez colectada la biomasa aérea de *L. tenuis* y de las especies de referencia, se secan en estufa a 70°C durante 72 hs (Di Bella et al., 2019) y se calcula el rendimiento (MgMS ha^{-1}). Todas las muestras serán utilizadas para evaluar el contenido de N de la biomasa aérea por el método Kjeldahl. Luego se muelen y pasan por malla menor a 1 mm de diámetro (Valles de la Mora y Cdisch, 2010), se colecta aproximadamente 1,5gr de biomasa y se coloca en cápsulas para su posterior análisis por espectrometría de masas de radio isotópico en el Laboratorio de Isótopos Estables en Ciencias Ambientales (LIECA) (CONICET-Mendoza). Con ello se obtendrán valores de abundancia natural de N^{15} de la biomasa aérea de *L. tenuis* y de las plantas de referencia. Estos serán utilizados posteriormente para calcular el porcentaje de N en planta proveniente de la FBN (%Ndfa).

En cada subparcela se está contando el número de nódulos activos (considerando como activos, aquellos con coloración rosada (Di Bella et al., 2019); y se mide la masa seca de nódulos activos (Kg ha^{-1}) asociados a *L. tenuis*.

Muestreo de suelo y determinaciones analíticas generales

Debido a que la dinámica del N en el suelo puede estar influenciada por distintos factores edáficos, se realiza una caracterización del suelo por estación del año, con el fin de poder evaluar si existe relación entre los ingresos de N al sistema y los valores de ciertos parámetros edáficos. Para ello se está tomando una muestra compuesta de suelo -a partir de diez submuestras- por estación de crecimiento, a dos profundidades (0-20 y 20-40 cm) en cada parcela, las cuales se conservan refrigeradas hasta su análisis. Las determinaciones a realizar sobre las muestras son las siguientes: pH en una solución suelo-agua 1:2,5 con pHmetro (Page, 1982), concentración de nitratos por nitración del Ácido Salicílico (Cataldo et al., 1975), N orgánico total por la metodología Kjeldahl (Bremner y Mulvaney, 1982), concentración de NH_4^+ Mulvaney (1996), fósforo extractable (Bray y Kurtz, 1945), conductividad eléctrica sobre el extracto de saturación de las muestras de suelo (Rhoades, 1982) y relación de adsorción de sodio (Sumner y Miller, 1995). Para poder realizar esta última determinación previamente se realiza la extracción de los cationes intercambiables (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+) utilizando el método de acetato de amonio pH 7 (Simard,



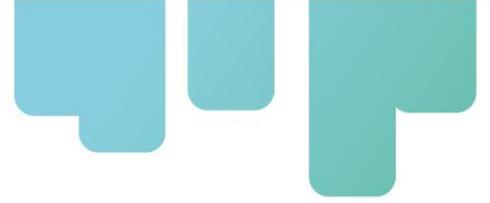
1993), determinándose las concentraciones de los cationes con espectrofotómetro de absorción atómica Varian 2005.

Estado de avance de la investigación

Los sitios de muestreo fueron delimitados y se realizaron las primeras tomas de muestras de vástago (Fotografía 1) para su análisis por espectrometría de masas de radio isotópico, de raíces para evaluar los nódulos activos y de suelo para contrastar parámetros de interés. Aún no se han procesado los datos obtenidos.

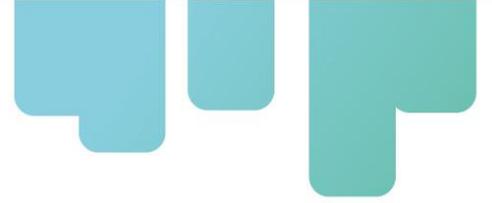


Fotografía 1: Muestreo de *L. tenuis* para determinación de N^{15} y de nódulos activos.

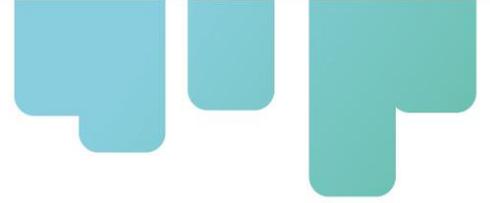


Referencias Bibliográficas

- Antonelli, C. J., Calzadilla, P. I., Escaray, F. J., Babuin, M. F., Campestre, M. P., Rocco, R., Bordenave, C. D., Perea García, A., Nieva, A. S., Lames, M. E., Maguire, V., Melani, G., Serena, D., Bailleres, M., Carrasco, P., Paolocci, F., Garriz, A., Méndez, A. & Ruiz, O. A. (2016). Lotus spp: Biotechnological strategies to improve the bioeconomy of lowlands in the Salado River Basin (Argentina). *AGROFOR International Journal*, 1.
- Batista, W. B., Taboada, M. A., Lavado, R. S., Perelman, S. B. & León, R. J. (2005). Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando León. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina, 113-129.
- Bocchio, V., Requesens, E. y Mestelan, S. (2019). Tendencias y equitatividad de los principales cultivos extensivos en el centro de la provincia de Buenos Aires. Ediciones INTA.
- Bray R. H. and Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci*, 59:39–45.
- Bremner, J. M. and Mulvaney, C. S. (1982). Total Nitrogen. In: Page AL Ed. Methods of soil Analysis. Part 2. 2nd Edition. Madison, Wisc, American Society of Agronomy, (Agronomy Series no. 9) pp. 595-624.
- Criado, C. A. (2014). Lotus PAMPA INTA. Una herramienta de trabajo para los suelos bajos—inundables. Publicación Técnica Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Di Bella, C. E., García-Parisi, P. A., Lattanzi, F. A., Druille, M., Schnyder, H. & Grimoldi, A. A. (2019). Grass to legume facilitation in saline-sodic steppes: influence of vegetation seasonality and root symbionts. *Plant and Soil*, 443(1-2), 509-523.
- Druille, M., Acosta, A. P., Acosta, G. L., Rossi, J. L., Golluscio, R. Á., & Bailleres, M. (2017). Response to glyphosate application of beneficial soil fungi associated with Lotus tenuis. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(3), 297-302.
- Eckard, R. J., Chapman, D. F. & White, R. E. (2007). Nitrogen balances in temperate perennial grass and clover dairy pastures in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58 (12), 1167-1173.
- Escaray, F. J., Menendez, A. B., Gárriz, A., Pieckenstain, F. L., Estrella, M. J., Castagno, L. N., Carrasco, P., Sanjuan, J. & Ruiz, O. A. (2012). Ecological and agronomic importance of the plant genus Lotus. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant science*, 182, 121-133.
- Espasandin, F. D., Calzadilla, P. I., Maiale, S. J., Ruiz, O. A. & Sansberro, P. A. (2018). Overexpression of the arginine decarboxylase gene improves tolerance to salt stress in Lotus tenuis plants. *Journal of plant growth regulation*, 37 (1), 156-165.
- Fucks, E., Pisano, F., Carbonari, J. y Huarte, R. (2012). Aspectos geomorfológicos del sector medio e inferior de la Pampa Deprimida, provincia de Buenos Aires. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 25, 1-2.



- Inostroza, L., Acuña, H. & Méndez, J. (2015). Multi-physiological-trait selection indices to identify *Lotus tenuis* genotypes with high dry matter production under drought conditions. *Crop and Pasture Science*, 66(1), 90-99.
- Landriscini, M. R., Galantini, J. A., Duval, M. E. & Capurro, J. E. (2019). Nitrogen balance in a plant-soil system under different cover crop-soybean cropping in Argentina. *Applied Soil Ecology*, 133, 124-131.
- Ledgard, S. F. (1989). Factors affecting isotopic fractionation during nitrogen fixation by pasture legumes. In: Association Francaise pour la Production Fourrage`re (Editors). Proc. XVI Int. Grassland Congress, I. Nice, INRA, France, pp. 123–126.
- Mulvaney, R. L. (1996) Nitrogen - inorganic forms. In Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods (D.L. Sparks Ed.). pp 1123-1184, SSSA, Madison, WI, USA.
- Nieva, A. S. D. V. (2018). *Estudio de la biodiversidad microbiana asociada con áreas edáficas marginales para la agricultura en la Pampa Deprimida (Buenos Aires, Argentina), bajo la influencia del monocultivo de Lotus tenuis: Análisis de la interacción entre Lotus spp. y Fusarium solani en el continuum mutualismo-patogénesis* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de General San Martín.
- Otondo, J. (2018). Experiencias a campo en la cuenca del salado. En Información técnica III jornada nacional forrajeras tropicales. INTA – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. INTA Ediciones.
- Page A. L. (1982). Ed. Methods of soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd Edition. American Society of Agronomy (*Agronomy Series* no. 9). Madison, Wisconsin. USA.
- Rhoades J.D. (1982). Soluble salts. Pp. 167-179. En Page, A.L., Miller, R.H. y Keendy D.R. (Eds). Methods of soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. (*Agronomy Series* no. 9). 2nd ed. Madison, Wisconsin, USA.
- Simard, R. R. (1993). Ammonium acetate-extractable elements, pp 39–42. In: Carter MR (ed), Soil sampling and methods of analysis. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Sumner, M. E. & Miller, P. (1995). Cation exchange capacity and exchange coefficients. P: 1209. In: Sparks D.L, Page A.L, Helmke P.A (Eds) Methods of soil analysis part 3: chemical methods. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA.
- Taboada, M. A., Damiano, F. y Lavado, R. S. (2009). Inundaciones en la región pampeana. Consecuencias sobre los suelos. Alteraciones de la fertilidad de los suelos: el halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones. *Sitio argentino de producción animal*, 103-127.
- Tzanakakis, V., Sturite, I. & Dörsch, P. (2017). Biological nitrogen fixation and transfer in a high latitude grass-clover grassland under different management practices. *Plant and soil*, 421 (1-2), 107-122.
- Unkovich, M., Herridge, D. A. V. I. D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., Alves, B. & Chalk, P. (2008). Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*.



- Valles de la Mora, B. & Cadisch, G. (2010). Determinación de la fijación biológica de N₂ usando la técnica de abundancia natural del N¹⁵ en tres ecotipos de cacahuate forrajero. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1 (2), 99-114.
- Vázquez, P. M., Cabria, N. F., Rojas, M. C. y Calandroni, M. B. (2009). Riesgo de Anegamiento: Estimaciones para la Cuenca Baja del Río Salado. *Ci. Suelo (Argentina)*, (2), 237-246.
- Vicente, E. J., & Dean, D. R. (2017). Keeping the nitrogen-fixation dream alive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (12), 3009–3011. Doi:10.1073/pnas.1701560114
- Vignolio, O. R., Cambareri, G. S. & Maceira, N. O. (2010). *Lotus tenuis* (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. *Revista Argentina de Producción Animal*, 30 (1), 97-116.
- Striker, G. G. and Colmer, T. D. (2017). Flooding tolerance of forage legumes. *Journal of Experimental Botany*, 68 (8), 1851-1872.
- Wermbter, R. G. y Ramallo, D. (1980). Carta detallada de la Chacra Experimental Manantiales. Subsecretaría de Asuntos Agrarios, provincia de Buenos Aires. INTA, Centro nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigación de Recursos Naturales, Departamento de suelos, Unidad de Reconocimiento de Suelos.

Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org