

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA ENTRADA DE
NITRÓGENO POR FIJACIÓN BIOLÓGICA EN CAMPO
NATURAL**

por

Gerónimo Agustín CARDOZO CABANELAS

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetal

MONTEVIDEO

URUGUAY

Septiembre 2019

Tesis aprobada por el tribunal integrado por PhD Amabelia del Pino, PhD Carlos Nabinger, y Dr. Gervasio Piñeiro, el 16 de diciembre de 2019. Autor: Ing Agr. Gerónimo Cardozo. Director Dr. Fernando A Lattanzi.

Dedico este trabajo a Emilia, Octavio y Vanessa

“Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos”.

Eduardo Galeano

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo recibido en primer lugar por mi familia, a mis hijos y esposa por el apoyo y paciencia frente a las ausencias asociadas a la Maestría; a mis padres, abuela, hermana y todos los hermanos políticos que me apoyaron de alguna forma u otra.

En segundo lugar, agradezco a las instituciones y personas que de alguna forma me ayudaron en este proceso de formación. Al INIA, institución que confié y permitió que le dedicara tiempo al posgrado, a Fernando Lattanzi en particular en su doble rol de tutor y director del Programa de Pasturas y Forraje, por la confianza y el apoyo. Del mismo modo debo agradecer a la Universidad de la República por la oportunidad de formación y a la ANII por el apoyo económico recibido.

De forma particular quisiera agradecer a:

Sr. Ignacio Gonzales, productor rural de las sierras de Rocha por permitirme hacer el experimento que dio puntapié a toda la tesis. A Néstor Serrón, Fernando Raymúndez, John Jackson, Darío Picciolli y Andrés Roldán, el equipo de apoyo del Laboratorio de Pasturas de INIA Treinta y Tres, sin los cuales no hubiese podido hacer las mediciones ni el procesamiento de muestras.

A los investigadores y docentes Diego Michellini, Martín Jaurena, Felipe Lezama, Rafael Reyno, Robin Cuadro, Walter Ayala y Mónica Balzarini, por los aportes realizados en el capítulo 2, y a Víctor Sadras y Facundo Lusich por los aportes realizados en el capítulo 3, todos de muchísima utilidad.

A todos los colegas que me facilitaron información y a todos los productores que abrieron las puertas de su casa de manera generosa para generar información.

Al tribunal por los aportes.

TABLA DE CONTENIDO

página

PÁGINA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. MEJORAMIENTOS EXTENSIVOS DE CAMPO NATURAL.....	1
1.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	4
1.3. MODELO CONCEPTUAL.....	8
1.4. ESTADO NUTRICIONAL DE LA PASTURA.....	12
1.5. OBJETIVOS.....	14
2. <u>EFFECT OF PHOSPHORUS FERTILIZATION ON “RÍO DE LA PLATA” NATURAL GRASSLAND FORAGE PRODUCTION, PHOSPHORUS CONCENTRATION AND N:P RATIO, AND ITS RELATIONSHIP WITH ENVIRONMENT, SPECIES COMPOSITION, AND FERTILIZER MANAGEMENT</u>	15
2.1. RESUMEN	15
2.2. SUMMARY	17
2.3. INTRODUCTION.....	18
2.4. MATERIALS AND METHODS	21
2.4.1. <u>Dataset</u>	21
2.4.2. <u>Data analysis</u>	23
2.5. RESULTS.....	27
2.5.1. <u>Absolute and relative response to P fertilization of ANPP, herbage P concentration and N:P ratio</u>	27
2.5.2. <u>Relationship between the size of the response to P fertilization and ancillary variables</u>	30
2.6. DISCUSIÓN.....	36

2.6.1. <u>Practical Implications</u>	39
2.7. REFERENCES	41
2.8. SUPPORTING INFORMATION.....	49
3. <u>FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN CAMPOS NATURALES MEJORADOS – PRINCIPALES IMPULSORES Y CONSECUENCIAS</u>.....	63
3.1. RESUMEN	63
3.2. SUMMARY	64
3.3. INTRODUCCIÓN.....	65
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
3.4.1. <u>Sitios y mediciones</u>	69
3.4.2. <u>Análisis estadístico</u>	70
3.5. RESULTADOS.....	72
3.5.1. <u>Caracterización de los sitios</u>	72
3.5.2. <u>Nivel de fijación biológica de nitrógeno</u>	74
3.5.3. <u>Factores que afectan la FBN</u>	76
3.5.4. <u>Estado nutricional de la pastura</u>	80
3.6. DISCUSIÓN.....	83
3.6.1. <u>FBN en MECN en contexto</u>	83
3.6.2. <u>Rol de la nutrición en la FBN</u>	84
3.6.3. <u>N del suelo y estado nutricional de las plantas</u>	84
3.7. CONCLUSIONES.....	87
3.8. BIBLIOGRAFÍA	88
3.9. ANEXOS.....	95
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	99
4.1. COMPARACIÓN GLOBAL	100
5. <u>CONCLUSIONES</u>	102
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	104
7. <u>ANEXOS</u>	115

RESUMEN

Los pastizales del “Río de la Plata” representan un extenso ecosistema en América del Sur, dominado por pastizales naturales. Su productividad primaria neta área (PPNA) está limitada principalmente por el clima y la fertilidad de suelos. Estos pastizales altamente biodiversos utilizados para la producción ganadera extensiva tienen consistentemente niveles de fósforo (P) en suelo y en planta bajos a muy bajos. Para aumentar su productividad se ha considerado, i) la fertilización con P (CNP), ii) la incorporación de leguminosas junto con la fertilización P, sin eliminar el tapiz natural (MECN). A pesar de existir numerosos trabajos sobre CNP en la región, no existe aún acuerdo de su impacto, ni de los mecanismos subyacentes. Aquí, presentamos un metaanálisis de 48 estudios sobre fertilización con P (428 comparaciones) realizados en Argentina, Brasil y Uruguay. La fertilización aumentó la concentración de P en la pastura más frecuentemente (54 vs 31% respuestas independientes) y, en mayor magnitud (55 vs 27% efecto medio relativo), que la PPNA. La proporción N:P del forraje se redujo en 61% de los casos y con un efecto promedio relativo 32%. Otras limitantes, particularmente el nitrógeno (N) parecen ser más importantes en función de los niveles de N:P en la pastura. Los MECN han sido una tecnología efectiva para incrementar la productividad de estos sistemas a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Sin embargo, no existen estimaciones de FBN en MECN ni se han estudiado los factores que la condicionan ni tampoco el efecto de la FBN en el resto de la comunidad. En 69 sitios en Uruguay se estimó la FBN y las principales variables de suelo y planta. En promedio $67 \pm 26\%$ del N proviene de FBN, con una eficiencia de $19,4 \pm 8,2$ (kg N fijado Mg MS⁻¹), ambas con gran variabilidad. Las características de suelo explican muy poco los niveles de FBN, desatacando la fertilización acumulada de P. La relación N:P para gramíneas-C₄ y graminoides- C₃ muestra una deficiencia relativa de N o exceso de P a pesar del N incorporado por FBN.

Palabras clave: pastizales del “Río de la Plata”, fertilización fósforo, fijación biológica de nitrógeno, N:P en planta

CAUSES AND CONSEQUENCES OF NITROGEN ENTRY FOR BIOLOGICAL FIXATION IN NATURAL GRASSLANDS

SUMMARY

“Río de la Plata” grasslands represent an extensive ecosystem in South America, dominated by natural grasslands. Aerial net primary production (ANPP) is mainly limited by climate and soil fertility. These highly biodiverse grasslands are used for extensive livestock systems that consistently have low to very low phosphorus (P) levels in soil and plants. In order to increase its productivity, it has been considered, i) the fertilization with P (NGP), ii) the incorporation of legumes along with P fertilization, without eliminating natural species (ING). Despite of numerous works on NGP, there is still no agreement on its impact, nor on the underlying mechanisms. Here, a meta-analysis of 48 studies on fertilization with P (428 comparisons) conducted in Argentina, Brazil and Uruguay is presented. Fertilization increased herbage P concentration more frequently (54 vs. 31% independent cases) and, to a greater extent (55 vs. 27% relative mean effect), than ANPP. The N:P proportion of forage was reduced in 61% of cases with relative mean effect of 32%. Other limitations, particularly nitrogen (N) appear to be more limiting according to N:P of pasture. INGs have been an effective technology to increase productivity of these systems through biological nitrogen fixation (BNF). However, there are no estimates of BNF in ING, neither there are studies on the constraining factors nor the effect of BNF on the rest of the community. In 69 sites in Uruguay, BNF and main soil and plant variables were estimated. On average $67 \pm 26\%$ of N comes from BNF, with an efficiency of 19.4 ± 8.2 (kg N fixed Mg DM⁻¹), both with great variability. Soil characteristics do not explain BNF much, but the accumulated fertilization with P is relevant. N:P ratio for grasses-C₄ and graminoids-C₃ shows a relative deficiency of N or excess in P despite the N incorporated by BNF.

Keywords: “Río de la Plata” grassland, phosphorus fertilization, biological nitrogen fixation, N:P plant

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MEJORAMIENTOS EXTENSIVOS DE CAMPO NATURAL

Los pastizales del “Río de la Plata” (PRP) representan el Bioma Pampa al sur de América del Sur formado por las regiones de Pampas y Campos (Campo Natural en Uruguay, CN) (Allen et al., 2011). Actualmente, menos de 280.000 km² (de los ~700.000 km² originales) de este bioma siguen siendo pastizales naturales en Argentina (Baeza, 2016; Viglizzo y Jobbáy, 2010), Brasil (Andrade et al., 2015; Trindade et al., 2018) y Uruguay (MGAP-DIEA, 2013). Estos pastizales templados y subtropicales, subhúmedos, caracterizados por una gran diversidad de plantas (Andrade et al., 2018) y animales (Bilenca y Miñarro, 2004), se utilizan principalmente para la producción ganadera extensiva, pero también brindan otros servicios ecosistémicos importantes, incluidos el suministro de agua, el control de la erosión y la regulación del ciclo de nutrientes (Modernel et al., 2016). Las principales limitantes de la productividad de estos pastizales son la disponibilidad de agua, mediada por la capacidad de almacenamiento de agua de los suelos (Bettolli et al., 2010), la temperatura y radiación en los meses de invierno, y la fertilidad del suelo (Berretta et al., 2000; Nabinger et al., 2000). Esto determina que la productividad invernal sea baja y que el crecimiento en los meses más cálidos sea muy variable en función del régimen de precipitaciones. Por tanto, y sumado al hecho de que el sobrepastoreo es la situación más extendida (Carvalho y Batello, 2009), en las diferentes comunidades predominan especies estivales, principalmente gramíneas C₄ postradas, en menor medida gramíneas invernales (C₃). La relación entre C₃/C₄ se modifica con la latitud, adquiriendo mayor importancia las invernales hacia el sur oeste de la región (Berretta et al., 2000). La frecuencia y el aporte de leguminosas nativas es baja en general, limitando muchas veces la calidad de éste recurso forrajero (Milot et al., 1987).

Los suelos predominantes en los PRP son Phaozems, Leptosoles, Planosoles y Acrisoles (Gardi et al., 2013), con un alto contenido de materia orgánica en general y un bajo contenido de P extraíble (Bray y Kurtz, 1945), típicamente menor a 5 ppm en los Campos (Hernández et al., 1995; Macedo, 1984) y menos de 10 ppm en las Pampas (Darwich, 1983). Estos son valores muy por debajo de los umbrales utilizados para diagnosticar la deficiencia de P en gramíneas C₃ y C₄ (Mallarino et al., 2013). Al mismo tiempo, las concentraciones de P del forraje en las especies dominantes varían de 1,2 a 1,4 mg P g de materia seca⁻¹ (Ungerfeld, 1998), más bajas que los valores citados como referencia a nivel global para graminoides de 1,9 mg P g de materia seca⁻¹ (Vergutz et al., 2012). Previo a tener esta información, Ficher G. en 1935, citado por Astori et al. (1979), señala el impacto obtenido en trabajos exploratorios de fertilización de CN en Uruguay con nitrógeno (N) y fosforo (P), pero también la variabilidad de los mismos y el dudoso impacto económico (Astori et al., 1979). No fue sino hasta los años 50 que se produjo un cambio de paradigma en el estudio del problema forrajero en Uruguay, donde se incorpora plenamente el modelo neozelandés, con un fuerte ímpetu por la fertilización fosfatada y el uso de leguminosas, que se realizan nuevos trabajos de fertilización en CN (Astori et al., 1979). A fines de los 50' experimentos más sistemáticos mostraban el potencial de la fertilización con N y P en CN regenerados en "La Estanzuela" con incrementos sorprendentes respecto al testigo (Hatchondo, 1958). En los últimos 60 años, se han realizado muchos ensayos de fertilización con P en la región. En Uruguay, por ejemplo, Carámbula (1978) revisó los resultados de 16 experimentos sobre la respuesta a la fertilización con P de los pastizales de Campos en los años 60 y 70, y concluyó que la gran variabilidad en la respuesta entre los sitios, con incrementos de entre 11-90% respecto al testigo, se asoció a la capacidad de retención de agua del suelo y la presencia o ausencia de leguminosas nativas (Carámbula, 1978). El gran volumen de información producida desde entonces tanto en Uruguay como en la región, que comprende principalmente literatura gris (tesis de grado y posgrado,

boletines o notas técnicos, etc.), no se ha analizado exhaustivamente, menos a escala de Bioma.

Los “Mejoramientos de Campo Natural” (MECN) que implican la siembra de leguminosas invernales exóticas, de alto potencial de crecimiento junto con la fertilización fosfatada, sin la eliminación del tapiz natural, es una tecnología que ha sido evaluada en Uruguay desde 1958 (Mederos et al., 1958) y ha sido adoptada de manera limitada, representando 4,4% (5,7 con CN fertilizado) de la superficie ganadera (MGAP-OPYPA, 2018). Los MECN pueden ser considerados como un subproducto de la importación del modelo neozelandés a partir de mitad de siglo XX, el cual mostró claros problemas para sustituir el CN por praderas sembrada a base de leguminosa y gramíneas mejoradas, junto con la fertilización fosfatada (Astori et al., 1979). Las especies de leguminosa utilizada en los MECN han sido variadas y han evolucionado con el tiempo destacándose en una primera etapa el trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.), que posteriormente es sustituida por trébol blanco (*Trifolium repens*. L) (Wilman et al., 2005) y en mayor medida por diferentes especies del género *Lotus* dada su mejor adaptación a las condiciones ambientales locales (Ayala y Carámbula, 2009; Escaray et al., 2012). Dentro de este Género se destaca hacia fines de los 80’ el *Lotus subbiflorus* Lag. cv “El Rincón” con la mayor área a nivel nacional (MGAP-DIEA, 2013). Los MECN buscan simultáneamente aumentar la producción total, invernal y mejorar la calidad nutricional, basado en la productividad de la leguminosa y la fijación biológica de nitrógeno (FBN), como mecanismo de ingreso de N en el sistema. Esto ha sido reportado en numerosos trabajos donde el nivel de incremento de productividad primaria neta aérea (PPNA) frente al testigo de CN varía desde 47% a más de 250% (Carámbula, 1978). El incremento en producción animal también es reportado en diferentes trabajos con el uso de varias especies de leguminosas e intensidades de pastoreo (Risso y Berretta, 1993; Soca et al, 2001; Ferreira et al., 2011; Del Pino et al., 2016). A largo plazo, existe controversia si los MECN son estables y del compromiso entre la pérdida de

biodiversidad y el aumento de productividad, mientras algunos autores señalan pocos efectos negativos a largo plazo (Tiecher et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Del Pino et al., 2016), otros autores mencionan los drásticos cambios en diversidad asociado a los niveles de aplicación de P en los MECN (Jaurena et al., 2016; Cáceres, 2019).

1.2. FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La FBN a nivel terrestre por la vegetación natural y la agricultura representan menos del 30% del nitrógeno total anual fijado, tanto por vías naturales como industriales en la superficie terrestre y los océanos, que alcanza un total de 413 Tg año⁻¹. Las estimaciones para FBN en sistemas naturales y en sistemas agrícolas no difieren sustancialmente dado el grado de incertidumbre, 58 ±29 y 60 ±18 Tg ha⁻¹, respectivamente (Fowler et al., 2013). El proceso de FBN derivado de la acción de microorganismos diazótrofos o de la asociación entre bacterias y plantas es considerado un elemento central para la sustentabilidad de los sistemas agrícolas y pastoriles en la medida que permite de manera simultánea mejorar varios aspectos que incrementan la eficiencia. Por ejemplo, permite la reducción en el uso de fertilizantes nitrogenados de origen industrial, a través de su uso como cultivo de cobertura, abono verde, en rotaciones de cultivos, policultivos, entre otras (Ledgard y Giller, 1995). También es posible señalar que las leguminosas y la FBN en sistemas pastoriles permite mejorar el desempeño animal, mejorando el valor nutritivo e incrementa el consumo total de forraje por los animales, al tiempo que los compuesto secundarios presentes en las leguminosas permiten mejorar la utilización del N y reducir los gases de efecto invernadero producto de la fermentación entérica (Luscher et al., 2014). La FBN en pasturas de mezcla de leguminosas y gramíneas ha sido ampliamente estudiada, la misma es afectada principalmente por la productividad y persistencia de la leguminosa, la competencia con la gramínea y el

nivel N en el suelo (Ledgard y Steele, 1992). A nivel nacional los antecedentes de medición de FBN son escasos y concentrados en pasturas cultivadas (García et al., 1994; Mallarino et al., 1990), siendo inexistentes registros para leguminosas en condiciones de MECN.

La fertilización fosfatada es clave en el proceso de instalación y producción de las leguminosas sembradas en los MECN dada la baja disponibilidad de P en los suelos en Uruguay (Hernández et al., 1995), la competencia que ejerce el tapiz natural y de lo esencial que resulta el P en el proceso de FBN. Este proceso enzimático (Nitrogenasa) desarrollado por bacterias en los nódulos de la leguminosa, implica la reducción de moléculas de N_2 a NH_4^+ con un alto costo energético (16 moles de ATP por mol de N_2) y es sensible a todos los factores que limite la formación, crecimiento y funcionamiento de los nódulos. La disponibilidad de P afecta de forma directa, modificando la actividad y el desarrollo de los nódulos, y en menor medida de forma indirecta, afectando el crecimiento de la planta y la demanda de N. El mecanismo de retroalimentación negativa de N, por acumulación de N en la planta y mayores valores de N:P, explica los efectos en la actividad de los nódulos (Divito y Sadras, 2014). Este mecanismo, que implica una regulación “hacia abajo” (down-regulation) se da tanto en ambientes deficitarios de nutrientes (Almeida et al., 2000), como también en ambientes ricos en N producto de la fertilización nitrogenada (Zanetti et al., 1996). El incremento en la disponibilidad de N reduce la FBN y la presencia de leguminosas a escala de potrero en muchas situaciones (Ledgard et al., 2001; Schipanski y Drinkwater, 2012), afectando también los ciclos de competencia entre la leguminosa y las gramíneas en pasturas mezclas (Ledgard y Steele, 1992; Schwinning y Parsons, 1996). A nivel nacional se puede señalar una basta experimentación respecto a niveles de fertilización P y fuentes de P para los MECN en todas las regiones del país, con respuestas positivas aunque variables al incremento de dosis y con alguna ventaja de las fuentes insolubles (fosforita) en los suelos ácidos (Risso y Berretta, 2001; Quincke y Cuadro, 2019).

Para la cuantificación del nivel de FBN existen diferentes técnicas y metodologías, el uso de técnicas isotópicas y particularmente la técnica de abundancia natural de ^{15}N , es la recomendada para leguminosas forrajeras puras o en mezclas con gramíneas (Unkovich et al., 2008). Adicionalmente, en los últimos años se ha incrementado de manera sustancial el conocimiento de los patrones isotópicos de N y de los procesos de fraccionamiento a escala de ecosistema (Craine et al., 2015), y particularmente sobre el proceso de FBN (Chalk et al., 2019). La contribución del N derivado de la fijación atmosférica al total adquirido por las plantas de leguminosas usando la técnica de abundancia natural ^{15}N , se basa en el hecho de que la composición isotópica del N [$\delta^{15}\text{N} (\%) = (^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}_{\text{sample}}) / (^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}_{\text{standard}}) - 1) \times 1000$] atmosférico difiere del N derivado de la materia orgánica del suelo (Hogberg, 1997). La concentración de N y la composición isotópica se determina en muestras de la parte aérea de las plantas, que es secada en horno, pesada y triturada hasta obtener un polvo fino, éste es colocado en cápsulas de estaño y se analiza en un analizador elemental acoplado a un espectrómetro de masas de relación isotópica. El porcentaje de N derivado de la fijación de N atmosférico (% Nfix) se estima como:

$$\% \text{ Nfix} = (^{15}\text{N}_{\text{plant ref}} - ^{15}\text{N}_{\text{plant fix}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{plant ref}} - \text{B}) \times 100 \quad (1)$$

donde “ $^{15}\text{N}_{\text{plant fix}}$ ” es el $\delta^{15}\text{N}$ de la muestra de leguminosas, “B” es el $\delta^{15}\text{N}$ de una planta cuyo suministro de N depende completamente de la fijación atmosférica, y “ $\delta^{15}\text{N}_{\text{plant ref}}$ ” es el $\delta^{15}\text{N}$ de una planta no nodulada cuyo suministro depende completamente del N del suelo. El valor de “B” y “ $\delta^{15}\text{N}_{\text{plant ref}}$ ” deben ser medidos o estimados siguiendo las recomendaciones en la materia y la situación particular a evaluar (Unkovich et al., 2008). Esta técnica provee un valor integrado en el tiempo y no puntual, no requiere el agregado de ninguna sustancia previa a la medición, es apropiado para evaluaciones a escala productiva y permite hacer estimaciones del aporte de N vía FBN con poca información adicional. Sin embargo algunas de las limitantes del uso de la abundancia natural de ^{15}N radican en las posibles diferencias

entre los sistemas radiculares de las plantas fijadoras y no fijadoras, en la baja o muy variable disponibilidad de N en los suelos (Unkovich et al., 2008). A partir de esta técnica se han estimado en numerosos trabajos las transferencias de N-FBN desde las leguminosas hacia las plantas no fijadoras, sin embargo esto es criticado por varios autores que señalan las limitantes derivadas de la variabilidad de las distintas fuentes de N (Peoples et al., 2015).

Los principales factores de stress abiótico que afectan la FBN y el crecimiento de la leguminosa son la temperatura y la disponibilidad de agua (Chalk et al., 2010), actuando de forma individual o combinada afectando diferentes procesos metabólicos (Signorelli et al., 2015). La acidez del suelo determinada por bajos valores de pH y la presencia de aluminio intercambiable, es un factor que limita la FBN, afectando en mayor medida a las bacterias que a la planta de la simbiosis, encontrando una enorme variación entre genotipos de ambos organismos (Ledgard y Giller, 1995; Unkovich, 2012). Existen pocos trabajos en donde se asocia el nivel de FBN con la acidez del suelo, en estudios de carácter observacional a escala regional son reportados efectos en cultivos (Collino et al., 2015) y pasturas (Riffkin et al., 1999). La persistencia de las bacterias integrantes de la asociación con leguminosas es un elemento que condiciona la FBN, adicionalmente al pH, las condiciones climáticas (temperatura y humedad) condicionan la supervivencia de estos microorganismos (Drew et al., 2012), así como la capacidad de competir con otros organismos nativos del suelo (Gutiérrez, 2017). Además del P otros nutrientes como potasio (K) o azufre (S) afectan la FBN a través del mismo mecanismo que P (N “*down regulation*”), por un aumento de las relaciones N:K y N:S (Divito y Sadras, 2014).

1.3. MODELO CONCEPTUAL

Desde un punto de vista conceptual, los MECN pueden ser analizados como cualquier otra pastura mezclas de gramíneas y leguminosas, la asociación de raigrás perenne con trébol blanco es sin dudas la mezcla más estudiada a nivel global. Son pocos los lugares en el mundo donde se introduce leguminosas templadas en una comunidad mayoritariamente subtropical (C₄). Predominan así, los trabajos con especies templadas y en los escasos trabajos con especies tropicales muchas veces las leguminosas son sub arbustivas. Ledgard y Steele (1992) plantean el primer modelo conceptual de este sistema de interacción gramínea-leguminosa (Figura 1), aunque simple este modelo capta los cuatro elementos centrales y las relaciones entre ellos, destacando la “Persistencia y productividad de la Leguminosa”, “FBN”, “N del suelo” y “Competitividad de la Gramínea” (Ledgard y Steele, 1992). No incorpora el P como un elemento central dado que se parte de niveles de suficiencia, situación diferente a la realidad de los MECN en Uruguay.

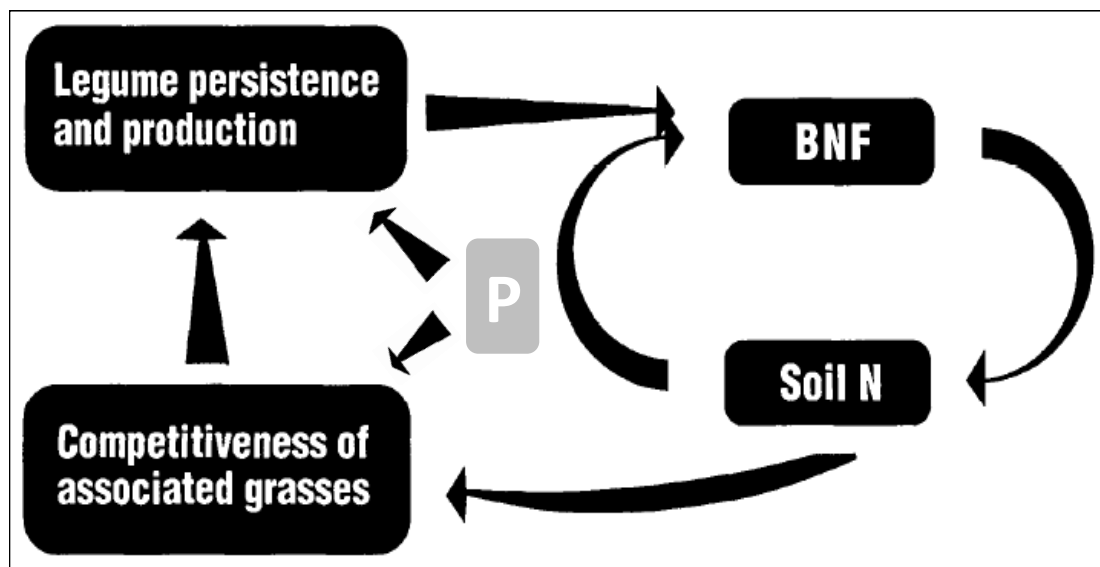


Figura 1. Diagrama de los principales factores que interactúan en pasturas mezclas de leguminosas/gramíneas, modificado de Ledgard y Steele (1992).

A partir de esta misma base conceptual, pero avanzando hacia un modelo cuantitativo y de simulación, Schwinning y Parsons (1996) plantan un modelo de 8 variables (Figura 2) en la que diferencian para el componente gramíneo y leguminoso (1 y 2 respectivamente) tres elementos, el componente estructural de C:N (XC:XN), y los sustratos de C y de N (SC y SN) por separado, el modelo se completa con el nivel de nitrógeno mineral y orgánico presente en el suelo (Schwinning y Parsons, 1996). Este modelo matemático centra la competencia de las plantas en función de la disponibilidad de N del suelo, siendo las leguminosas más competitivas que las gramíneas hasta cierto nivel de N en suelo por la FBN. La retroalimentación dada por la mayor competitividad de las gramíneas a altos niveles de N del suelo es lo que genera las fluctuaciones a lo largo del tiempo. Sin embargo, la amplia mayoría de estudios experimentales o esfuerzos por modelar las pasturas mezclas, no evalúan el efecto del nivel de P ni en suelo ni en planta. En el caso de los MECN donde la baja disponibilidad de P (Hernández et al., 1995) y la alta capacidad de retención de los suelos genera frecuentes déficits de P para la leguminosa (Hernández y Zamalvide, 1998), debe ser un elemento a considerar. Es por ese motivo que se propone incorporar en el modelo de Schwinning y Parsons (1996) la variable fósforo, tanto a nivel de suelo como de planta (Figura 3). En la Figura 3 se señalan líneas rojas que indican el proceso estudiado en el artículo 1, mientras que las líneas azules identifican algunos de los procesos abordados en el artículo 2, de la presente tesis.

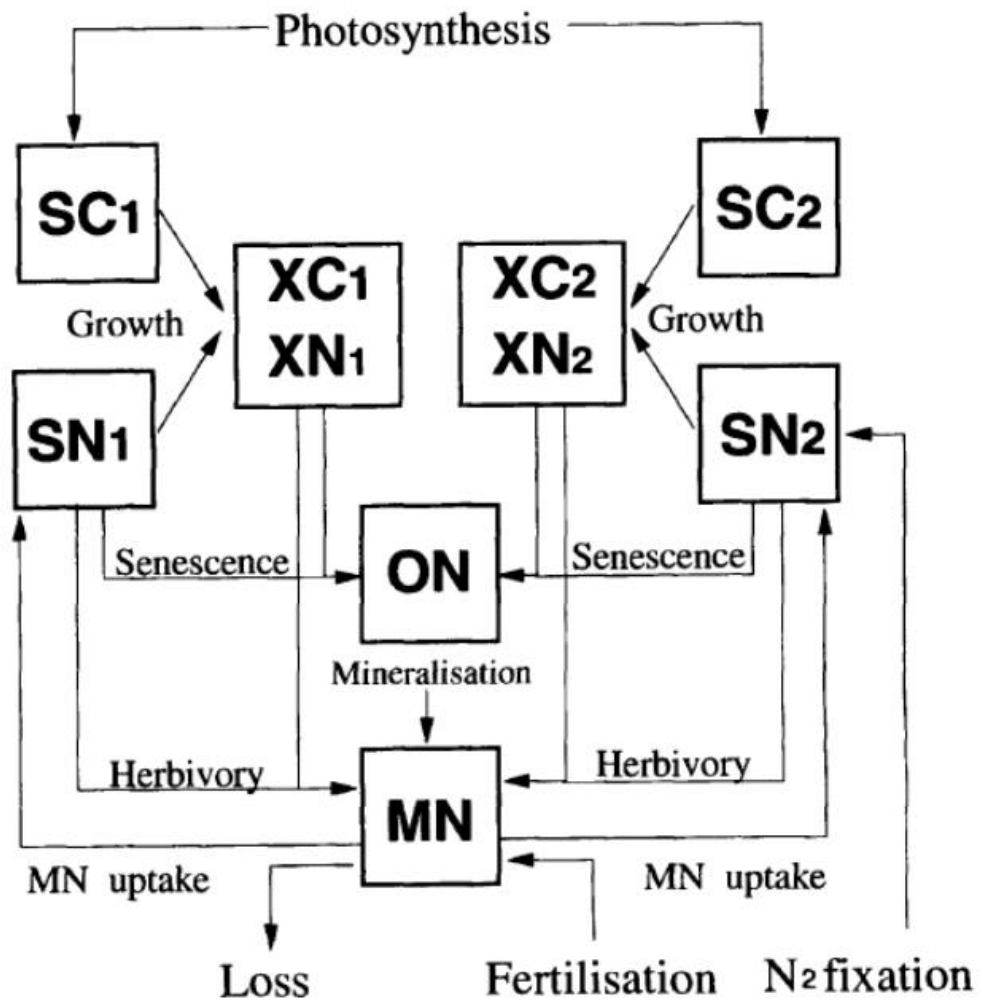


Figura 2. Modelo de 8 variables propuesto por Schwinning y Parsons (1996)

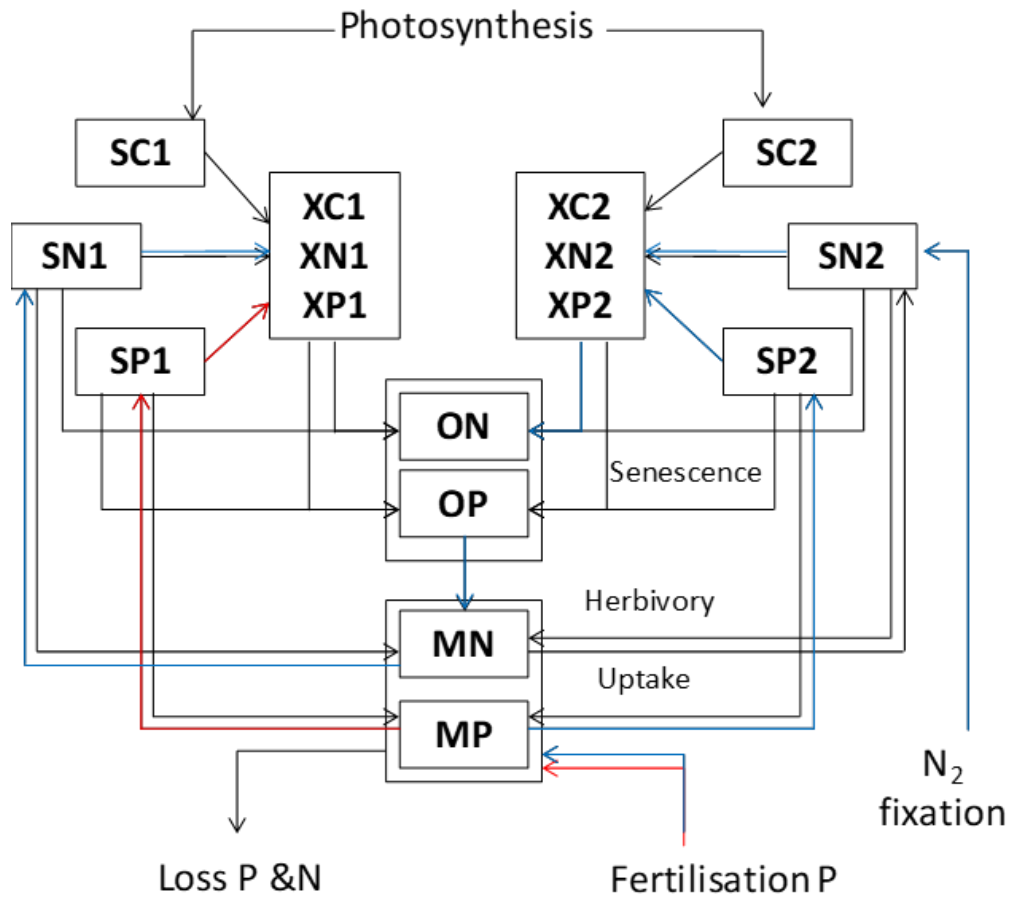


Figura 3. Modelo modificado de Schwinning y Parsons (1996), que incorpora el P en los componentes vegetales de la leguminosa y la gramínea, y en el componente orgánico y mineral del suelo. Las líneas rojas indica el proceso estudiado en el Capítulo 2, las líneas azules algunos de los procesos abordado en el Capítulo 3.

1.4. ESTADO NUTRICIONAL DE LA PASTURA

El estado nutricional de las leguminosas sembradas en los MECN, así como del resto de los componentes presentes en la comunidad del CN, puede ser evaluada a través de diferentes indicadores que reflejan la disponibilidad y el uso de uno o más nutrientes. El contenido de N y P de la planta no representa *per se* un indicador del estado nutricional de las mismas, al no considerar el concepto de dilución de nutrientes con el incremento de la biomasa, cayendo en comparaciones equivocadas (Sadras y Lemaire, 2014). Sin embargo, el uso de las relaciones estequiométricas entre diferentes elementos, principalmente N y P, ha sido propuesto para estimar limitantes o deficiencias relativas entre elementos en ambientes naturales (Güsewell, 2004; Koersemlan y Meuleman, 1996), como en cultivos (Sadras, 2006). En consecuencia, relaciones N:P inferiores a 10-15 indicarían una limitación de N, mientras que relaciones por encima de 20-25 indicarían una limitación de P, y entre ambos rangos se produciría una co-limitación (Güsewell, 2004; Koersemlan y Meuleman, 1996). Sin embargo, éste enfoque ha sido criticado por su escasa utilidad para predecir la limitación real de N, P o ambos, en situación con y sin adición de nutrientes, para algunas pastizales en Sudáfrica (Craine et al., 2008). Tanto el agregado de P como la incorporación de N vía FBN puede modificar la relación N:P. Para un número limitado de pastizales la concentración de P aumenta con la fertilización P, sin efectos sobre la concentración de N (Li et al., 2016). Éste consumo de lujo de P se da cuando otros factores limitan fuertemente el crecimiento, como el agua u otros nutrientes (Gong et al., 2011).

El concepto de dilución de nutrientes con el incremento de la biomasa de las plantas ha permitido el desarrollo de índices que evalúan el estado nutricional en función del desarrollo del cultivo, así el Índice de Nutrición Nitrogenada (INN), permite compara en cada momento del ciclo de un cultivo el nivel actual de N (concentración), con el nivel necesario para alcanzar el máximo potencial de

crecimiento en ese momento dado (Lemaire et al., 2008). La curva de dilución de N y la determinación del Nitrógeno crítico (N_c), base para el cálculo de INN, ha sido estudiada para numerosos cultivos C_3 y C_4 , gramíneas o leguminosas, llegando a determinar ecuaciones generales así como particulares para un cultivo (Gastal y Lemaire, 2002). El INN por tanto es un índice relativo, por lo general de 0 a 1, pero puede tomar valores superiores en los casos de exceso de N en la planta. El INN de las leguminosas depende en gran medida del nivel de FBN y de la disponibilidad de N del suelo. Modelaciones con estos tres parámetros permiten estimar la FBN en función del INN de la leguminosa y de N del suelo, sugiriendo que valores de INN superiores a 0,8 reducen la FBN; también hay una reducción muy drástica de 100 a 60% en FBN al incrementarse de 0 a 1 la disponibilidad de NO_3^- ($mol\ m^{-3}$) del suelo (Soussana y Tallec, 2010). El INN del resto de los componentes de las pasturas mezclas se espera sean afectados por el N derivado de la FBN de la leguminosa, aunque existen varios procesos que median esto. Por ejemplo, la transferencia de N de la leguminosa a las no-leguminosas en el corto plazo y de manera directa parece ser limitada, aunque esto está ampliamente reportado para situaciones de pasturas y policultivos (Thilakarathna et al., 2016). En pasturas pastoreadas, las dos vías principales de transferencia del N de la leguminosa hacia la gramínea es vía la excreta de los animales o por senescencia y mineralización (Ledgard y Giller, 1995), en sistemas extensivos esta última es más importante (Ledgard, 2001). Más recientemente se han hecho esfuerzos por sintetizar y avanzar sobre el estado nutricional de las plantas en base a los conceptos antes mencionados, la curva de dilución en función de la biomasa y las relaciones entre diferentes nutrientes para extender los avances conceptuales sobre N a otros elementos como P y K, sugiriendo la posibilidad de contar con índices para evaluar el estado nutricional de P por ejemplo (Lemaire et al., 2019).

1.5. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es analizar los mecanismos que determinan la entrada de nitrógeno atmosférico fijado biológicamente en Mejoramientos Extensivos de Campo Natural (MECN), así como los efectos en toda la comunidad. Dado que los MECN implican dos acciones centrales, la siembra de leguminosa (inoculada con microorganismos) y la fertilización fosfatada, se desglosó esto de forma parcial, por un lado, analizando de manera particular el efecto de la fertilización fosfatada en el CN sin el agregado de leguminosa. Mientras que, por otro lado, se analizó el efecto combinado, ya que las leguminosas sin fertilización no prosperan. Las hipótesis que sustentan cada uno de los dos trabajos son:

- 1) La productividad de los pastizales del Río de la Plata está limitada por la disponibilidad de fósforo del suelo desde que los niveles de P extractable de suelo y la concentración de P en planta es baja. Existen, además, factores edáficos, de la composición de la comunidad y del manejo de la fertilización que condicionan la respuesta a la adición de P.
- 2) Existe una alta variabilidad en los niveles de FBN en situaciones comerciales a escala regional (Uruguay) dada la variabilidad de ambientes (suelos y clima) y niveles de fertilización. La proporción del N-FBN en la leguminosa y los kg N-FBN por tonelada de materia seca de leguminosa es afectado por el estado nutricional de ésta y el nivel de fertilidad del suelo. El nivel de FBN afecta el estado nutricional de la comunidad, principalmente de las no leguminosas independiente del metabolismo (C_3 o C_4).

Los trabajos de investigación fueron escritos en formato de artículos, siguiendo las normas para autores, en el primer caso de la revista “Global Change Biology” y para el segundo fue usado las normas de “Agrociencia” Uruguay.

2. EFFECT OF PHOSPHORUS FERTILIZATION ON “RÍO DE LA PLATA” NATURAL GRASSLAND FORAGE PRODUCTION, PHOSPHORUS CONCENTRATION AND N:P RATIO, AND ITS RELATIONSHIP WITH ENVIRONMENT, SPECIES COMPOSITION, AND FERTILIZER MANAGEMENT

2.1. RESUMEN

A nivel mundial, la productividad primaria de los pastizales está limitada por el nitrógeno (N) y el fósforo (P). La variabilidad en la extensión y magnitud de tales limitaciones es poco conocida, particularmente para los ecosistemas de pastizales naturales. Cerca de 280.000 km² del Bioma pampeano al sur de América del Sur siguen dominados por pastizales nativos altamente biodiversos utilizados para la producción ganadera extensiva. Los suelos tienen consistentemente niveles bajos de P disponible para las plantas, y una concentración de P en planta baja. Por lo tanto, se ha considerado a la fertilización con P una opción para aumentar su productividad. Aquí, se presenta un metaanálisis de 48 estudios sobre fertilización con P (428 comparaciones entre un control, un tratamiento no fertilizado y un tratamiento con fertilizante P) realizados en Argentina, Brasil y Uruguay. La fertilización aumentó la concentración de P en la pastura más frecuentemente (54 vs 31% respuestas independientes) y, en mayor magnitud (55 vs 27% efecto promedio relativo), que la PPNA. El efecto más frecuente y grande de la fertilización con P fue reducir la proporción N:P del forraje (61% de respuestas independientes, 32% de efecto promedio relativo). El P del suelo, la concentración de P en planta, el pH del suelo y la dosis de fertilización representaron el 70% de la variación en las respuestas a la fertilización de la concentración de P del forraje, y el 81% para la respuesta en relación N:P del forraje. Solo el 5% de la variación en la respuesta de PPNA a la fertilización con P fue explicada por cualquier combinación de todas las variables explicativas compiladas. Estos resultados indican que, a pesar del bajo estado de P

del suelo, la PPNA de los pastizales del Río de la Plata no está limitada en gran medida por la disponibilidad de P. Además, las proporciones generalmente bajas de N:P en parcelas no fertilizadas (90% por debajo de 14:1 y 65% por debajo de 10,5:1) sugieren que los pastizales en este bioma estarían limitados por una deficiencia generalizada de N. Este trabajo proporciona nuevos conocimientos para un manejo más sostenible de la fertilización con P.

Palabras claves: Bioma Pampa, producción de forraje, fósforo, nitrógeno, cambios estequiométricos.

2.2. SUMMARY

Worldwide, primary productivity of grasslands is limited by nitrogen (N) and phosphorus (P). Variability in the extent and magnitude of such limitations is little understood, particularly for rangeland agroecosystems. About 280.000 km² of the Pampa biome in southern South America remain dominated by highly biodiverse native grasslands used for extensive livestock production. Soils have consistently low plant available P, and herbage low P concentration. Therefore, P fertilization has been considered an option to increase their productivity. Here, we report a meta-analysis of 48 studies on P fertilization (428 comparisons between a control, unfertilized treatment and a P fertilized treatment) carried out in Argentina, Brazil and Uruguay. Fertilization increased herbage P concentration more frequently (54 vs 31 % of independent responses), and to a greater extent (55 vs 27 % average relative mean effect), than ANPP. The most frequent, and largest, effect of P fertilization was to reduce herbage N:P ratio (61 % of independent responses, 32 % average relative mean effect). Soil P, plant P status, soil pH, and fertilizer rate accounted for 70 % of the variation in the responses to fertilization of herbage P concentration, and 81 % of herbage N:P ratio. Only 5 % of the variation in the response of ANPP to P fertilization was accounted for any combination of all putative explanatory variables compiled. These results indicate that, in spite of low soil P status, the ANPP of the Río de la Plata grasslands is not limited to any large extent by P availability. Further, generally low N:P ratios in unfertilized plots (90 % below 14:1 and 65 % below 10.5:1) suggest that grasslands in this biome would be limited by widespread N deficiency. This work provides new insights for a more sustainable managements of P fertilization.

Keywords: Pampa biome, forage production, phosphorus, nitrogen, stoichiometric changes.

2.3. INTRODUCTION

Phosphorus (P) is a key element to the long-term productivity and sustainability of pasture-based animal production. P use on grasslands shows situations of both excess and deficiency. On one hand, P pollution on freshwater bodies and oceans has increased over the last decades, and high surface mineral and organic P fertilization of intensively managed agroecosystems have contributed to this problem (Sharpley et al., 2015). On the other hand, extensive pastoral livestock production systems show historically negative P balances and would require increased P inputs to maintain soil P status (Sattari, Bouwman, Martinez Rodríguez, Beusen & Van Ittersum, 2016). Further, these agroecosystems are currently under a strong pressure to increase their productivity in ways that do not compromise their environmental sustainability. Thus, understanding P dynamics in extensive livestock production systems is both essential and a major challenge (Haygarth, 1998; Sharpley et al., 2015)

The response of natural grasslands and rangelands to fertilization has been less studied than that of more intensively managed grasslands. For instance, it remains unclear to what extent their primary productivity is limited by nutrients. A global meta-analysis concluded that the aerial net primary production (ANPP) of grasslands is limited by both P and nitrogen (N) availability, roughly to the same extent (Elser et al., 2007). While many studies support this conclusion (Aydin & Uzun, 2005; Polat, Bükün & Okant, 2007), several others have reported little or no effect of P supply on ANPP (Hoglund, Miller & Hafenrichter, 1952; Bennett & Adams, 2001; Snyman, 2002; Avolio et al., 2014; Jouany, Cruz, Daufresne & Duru, 2011; Schneider, Cade-Menun, Lynch & Voroney, 2016). The causes underlying such variable responses are unclear, although interactions with water supply (Snyman, 2002) and different plants nutrient-acquisition strategies (Vance, Uhde-Stone & Allan, 2003; Lambers, Raven, Shaver & Smith, 2008) have been mentioned.

The “Río de la Plata” grasslands (RPG) Biome in southern South America comprise the Pampas and Campos regions (Allen et al., 2011). Currently, less than 280.000 km² (out of the original 700.000 km²) of this biome remain natural grasslands across Argentina (Baeza, 2016; Viglizzo & Jobbáy, 2010.), Brazil (Andrade et al., 2015; Trindade, da Rocha & Volk, 2018) and Uruguay (MGAP-DIEA, 2013). These temperate and subtropical sub-humid grasslands, characterized by a high diversity of plants (Andrade et al., 2018) and animals (Bilenca & Miñarro, 2004), are used mainly for extensive livestock production but they also provide other important services, including water provision, erosion control, and nutrient cycling (Modernel et al., 2016). Soils are mainly Phaeozems, Leptosols, Planosols and Acrisols (Gardi et al., 2014), with high organic matter content and low plant available P – extractable P (Bray & Kurtz, 1945) is typically less than 5 ppm in the Campos (Macedo, 1984; Hernández, Otegui & Zamalvide, 1995) and less than 10 ppm in the Pampas (Darwich, 1983). These are values well below thresholds used to diagnose P deficiency (Mallarino, Sawyer & Barnhart, 2013). Concurrently, herbage P concentrations in the dominant species range from 1.2 to 1.4 mg P g dry matter⁻¹ (Ungerfeld, 1998), lower than global values cited for graminoids of 1.91 mg P g dry matter⁻¹ (Vergutz, Manzoni, Porporato, Novais & Jackson, 2012).

Over the last 60 years, many fertilizer trials have been carried out in the region. In Uruguay, Carámbula (1978) reviewed results from 16 experiments on the response to P fertilization of Campos grasslands carried out on the 60’s and 70’s and concluded that the large variability between sites in the response was associated to soil water holding capacity and the presence/absence of legumes. The large volume of information produced since then comprises mainly gray literature that has not been comprehensively analyzed.

The aim of this study was to compile data and carry out a meta-analysis of the response to P fertilization of Campos and Pampas grasslands. Meta-analysis has

consolidated as a statistical tool to summarize results from many independent studies more effectively and quantitatively than traditional narrative review methods (Gurevitch & Hedges, 1999). Our hypothesis is that soil P availability is a major limitation to the ANPP of the “Rio de la Plata” grasslands. To assess it, we (i) estimated the average size effect of the response to P addition of the ANPP, herbage P concentration and the N:P ratio of natural grasslands in the Pampas and Campos, and (ii) analyzed the relationship of the variability of fertilization effects with environmental variables, plant functional types composition, and fertilizer source and management. If our hypothesis is correct, we expect frequent and large increases in ANPP, closely related to initial soil P status and P fertilizer rate, and relatively smaller changes in herbage P concentration and N:P ratio.

2.4. MATERIALS AND METHODS

2.4.1. Dataset

We compiled data on the response of natural grasslands in southern South America to P fertilization; specifically, data on 1) annual ANPP (either on dry matter (DM) or fresh matter (FM) basis), 2) herbage P concentration, and 3) herbage N:P ratio. Published data was obtained from scientific articles, graduate and postgraduate thesis, and technical reports produced at institutions such as INIA (Uruguay), INTA (Argentina) and EMBRAPA (Brazil). These data were found by searching web resources such as Google Scholar, Scopus, and the websites and libraries of various Universities and Institutes of the region. Unpublished data was also included; typically consisting on data from agronomical trials from researchers at INIA (non-replicated treatments were not included).

We established the following selection criteria to define which studies to include:

Region: trials carried out in the “Rio de la Plata” grasslands and in grasslands located in the ecotones with the Mata Atlantica biome in Brazil (Overbeck et al., 2007; Andrade, Bonilha, Ferreira, Boldrini & Overbeck, 2016) and the Espinal biome in Argentina (Oyarzabal et al., 2018).

Treatments: experiments with replicated and paired P fertilized versus unfertilized control treatments. Information of other treatments (e.g. lime application, fertilization with other nutrients, species addition) were not included.

Duration: at least one year of data, so that annual ANPP could be computed.

Response variables: a) ANPP, typically estimated by successive mechanical cuts. In most cases, ANPP was expressed in dry matter basis, but a few studies only reported fresh matter data. b) P and c) N concentration of the harvested herbage. From this, herbage N:P ratio was estimated. Not all three response variables were available in every study.

Besides the three response variables, a number of putative ancillary variables: we compiled information on soil organic matter content (SOM), pH-H₂O, clay content, soil available water capacity (AWC), soil available P (Bray & Kurtz, 1945), botanical composition, fertilization annual rate, cumulative rate in multiyear experiments, and fertilizer source (soluble or insoluble). Preferentially, information reported on the original source were used, but in some cases soil characteristics were obtained from soil type of the experiment (Gardi et al., 2014), and data from soil maps. Table S3 lists these secondary sources of information. Soil properties summarized included data reported on a given variable estimated by different methods (e.g. soil available P) were adjusted using regional coefficients.

For each site, we compiled the list of the 15 most dominant species. From this, we computed the proportion of species belonging to the following functional groups: C₄ species, C₃ species, legumes, P mobilizing species (D. Michellini comp. pers. Table S4: List of species), species with a ‘resource capture’ strategy (Cruz, et al., 2010; Jaurena, Lezama & Cruz, 2012) (Table 2).

The resulting database included 48 studies carried out between 1968 and 2016, comprising 43 experimental sites located between 28.0°-37.8° S and 50.4°-60.7° W, across 15 soil types and eight different regions: a total of 428 comparisons between a control, unfertilized treatment and a P fertilized treatment (hereafter referred to as “cases”; Table 1, Figure 1, Table S1 and S2).

Lack of information on Brazilian Campos region is associated with very acid soils, mostly with Al, where calcareous is ever recommended with P fertilization.

2.4.2. Data analysis

First, the frequency of positive, negative and neutral responses to P fertilization was computed. Response is considered from the comparison between fertilized to unfertilized treatments, a simple difference between treatment (Fertilized - Control), that is positive when fertilized treatment value is significantly upper than of unfertilized treatment, or negative when fertilizer treatment value is lower than unfertilized. Then, a meta-analysis was carried out for each response variable to determine the average effect of P fertilization (Gurevitch & Hedges, 1999). In all cases, a random model was used (DerSimonian–Laird) because variability between studies was significant (high values of Q and τ^2). Publication bias was assessed with funnel plots (Figure S1). Impact of potential yield or nutritional base line status was tested with fertilization response through ‘Control’ categorization for the three response variables, probabilistic categorization was done to have the same number of each one.

Boosted regression trees (BRT) were used to identify trends, ranges and thresholds on the effect of ancillary variables on the response to P fertilization of ANPP, herbage P concentration and herbage N:P ratio using the 12 explanatory variables. We followed (Elith, Leathwick & Hastie, 2008; Elith & Leathwick, 2017) recommendations: using a bag fraction of 0.5, a learning-rate of 0.01, and three ramifications, and step size of 50 trees. Then, we repeated the procedure 10 times and carried out an ANOVA on these results to assess which explanatory variables had statistically different contributions to the amount of the variation explained by the BRT. The variables identified by BRT as most important in explaining the response to P fertilization were then included in multiple lineal regression models.

Best models were selected based on r^2 and parsimony. Classification ancillary variables like fertilizer source (soluble or insoluble) and soil type were analyzed. Analyses were carried out using INFOSTAT (Di Rienzo, et al., 2015) and R-Studio (Version 1.1.456).

Data of ANPP reported in dry matter basis and fresh matter basis was analyzed independently because the second one is represented only for old studies concentrated in a restricted region with high variability between studies. The analysis with both datasets together reduces markedly the accuracy of results.

Table 1: Summary of the compiled database, ANPP-DM and ANPP-FM ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), Herbage P concentration ($\text{mg P}\cdot\text{g DM}^{-1}$), N:P ratio and principal soil properties: Soil P, pH, Soil Organic Matter (SOM %) and Clay (%) are presented as weighted mean \pm weighted standard deviation.

	Observations	Studies	Control	Soil P ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	pH	SOM (%)	Clay (%)
Overall	428	48		3.7 ± 2.1	5.6 ± 0.7	4.7 ± 2.7	24.9 ± 12.9
1) ANPP DM basis	159	27	2707 ± 3041	3.1 ± 2.2	5.7 ± 0.8	4.8 ± 2.2	29.7 ± 12.3
2) ANPP FM basis	85	4	2121 ± 1179	4.3 ± 1.1	5.4 ± 0.4	4.9 ± 3.7	15.3 ± 9.4
3) Herbage P concentration	135	10	1.2 ± 0.4	4.9 ± 3.4	5.5 ± 0.8	3.8 ± 0.8	29.1 ± 12.4
4) Herbage N:P ratio	49	7	9.9 ± 3.8	7.4 ± 3.2	6.3 ± 0.6	3.8 ± 0.8	24.3 ± 6.1

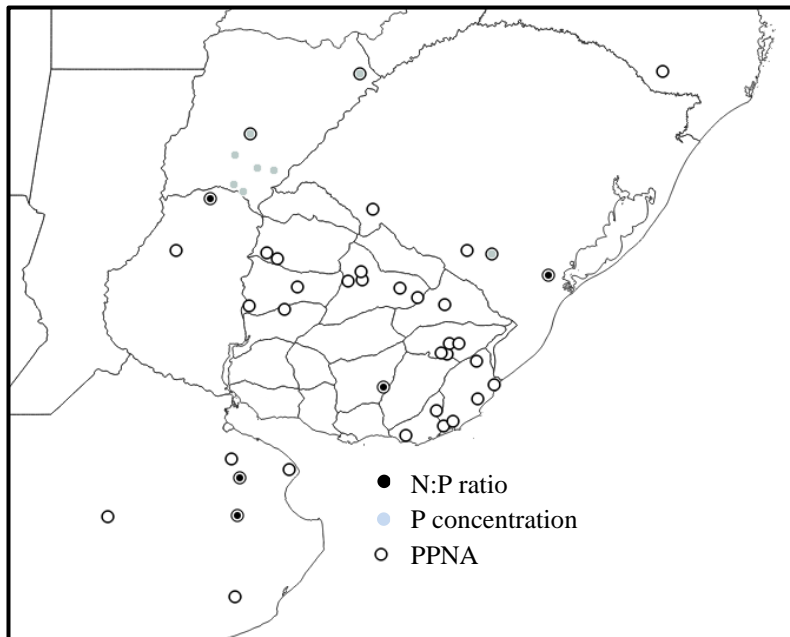


Figure 1. Location of “Rio de la Plata” grassland P fertilization experiments used in meta-analysis. Type of data used from each site is indicated.

Table 2: Plant functional type composition of 35 sites used in the meta-analysis, means and standard deviation.

	Means	sd
% C ₃	36%	20%
% Leg ¹	6%	10%
% Sol.P.sp ²	9%	10%
% RCS ³	52%	18%

¹% Leg: proportion of legumes sp.; ² % Sol.P.sp: proportion of P mobilizing species (Michellini com. pers); ³% RCS: ‘resource capture strategy’ (Cruz, et al., 2010, Jaurena, Lezama & Cruz, 2012)

2.5. RESULTS

2.5.1. Absolute and relative response to P fertilization of ANPP, herbage P concentration and N:P ratio.

P fertilization had no effect whatsoever on 49 % of independent cases, that is, in 210 out of the 428 comparisons the P fertilized treatment did not differ statistically from the unfertilized control on any of the response variables ($p < 0.05$; Z-test).

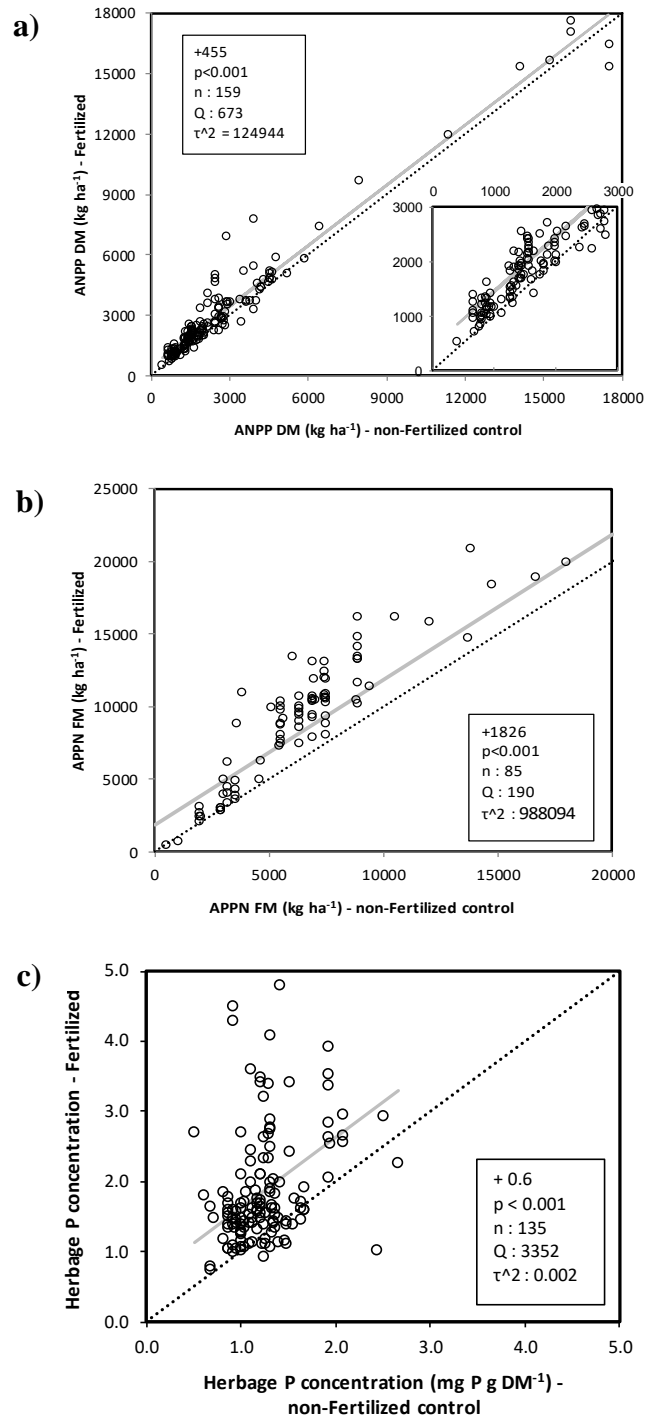
P fertilization increased herbage P concentration and reduced N:P ratios more frequently than increases in ANPP (54 and 61 vs. 31 % of independent responses respectively; Table 3). Phosphorus fertilization had an average positive effect on ANPP of $455 \text{ kg DM ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, and of $1826 \text{ kg FM ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$, that represent relative increases of $27 \pm 28\%$ and $45 \pm 33\%$, respectively (Figure 2a and b).

Table 3: Proportion of independent cases with statistically significant positive responses (different to zero) to P fertilization at two p-values.

	p<0.01	p<0.05
ANPP DM basis	0.31	0.40
ANPP FM basis	0.32	0.46
P concentration	0.54	0.62
N:P	0.61	0.67

ANPP-DM or FM level of responses could be interpreted as equivalents since dry matter percentage of 25 or reduction of 3-5 points on dry matter percentage between fertilized and non-fertilized (between 25-35% dry matter), produce similar results. Magnitude of increases on fresh matter results are explained because more water is accumulated on biomass of fertilized plots. The average effects of P fertilization on herbage P concentration was $0.6 \text{ mg P g DM}^{-1}$, representing a relative increase of $55 \pm 57\%$ (Figure 2c). Likewise, the average effect of P fertilization on herbage N:P ratio was a reduction of 4.05, representing a relative reduction of 33

$\pm 22\%$ (Figure 2d). Therefore, the magnitude of the effect of P fertilization was greater for P concentration and N:P ratio than for ANPP.



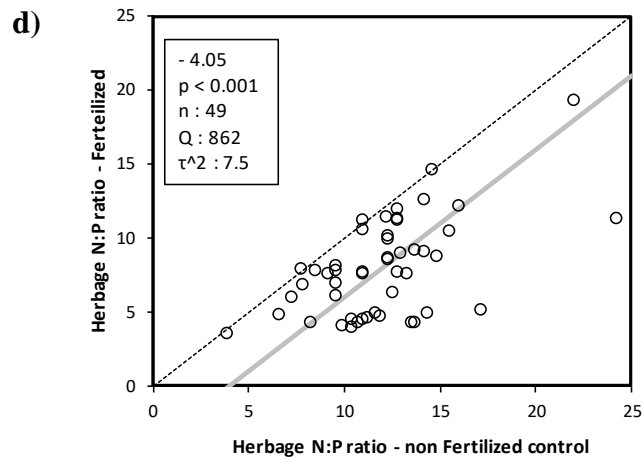


Figure 2. Relationship between Fertilized and non-Fertilized ('control') plots for a) ANPP on a DM basis ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), b) ANPP on a FM basis ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), c) Herbage P concentration ($\text{mg P g dry matter}^{-1}$), and d) Herbage N:P ratio. The dotted line indicates the 1:1 relationship (i.e. no effect), the continuous grey line indicates the average effect (number in box are: average effect, p value, number of pair wise comparisons, Cochran Q statistic and $\hat{\tau}^2$ variance between studies).

Absolute and relative effect to P fertilization on response variables showed significant trends for relative increases in ANPP and absolute increases in N:P when plotted against the value of the unfertilized control treatment (Figure 3a and c). For herbage P concentration response was similar for all unfertilized control categories, without trends (Figure 3b).

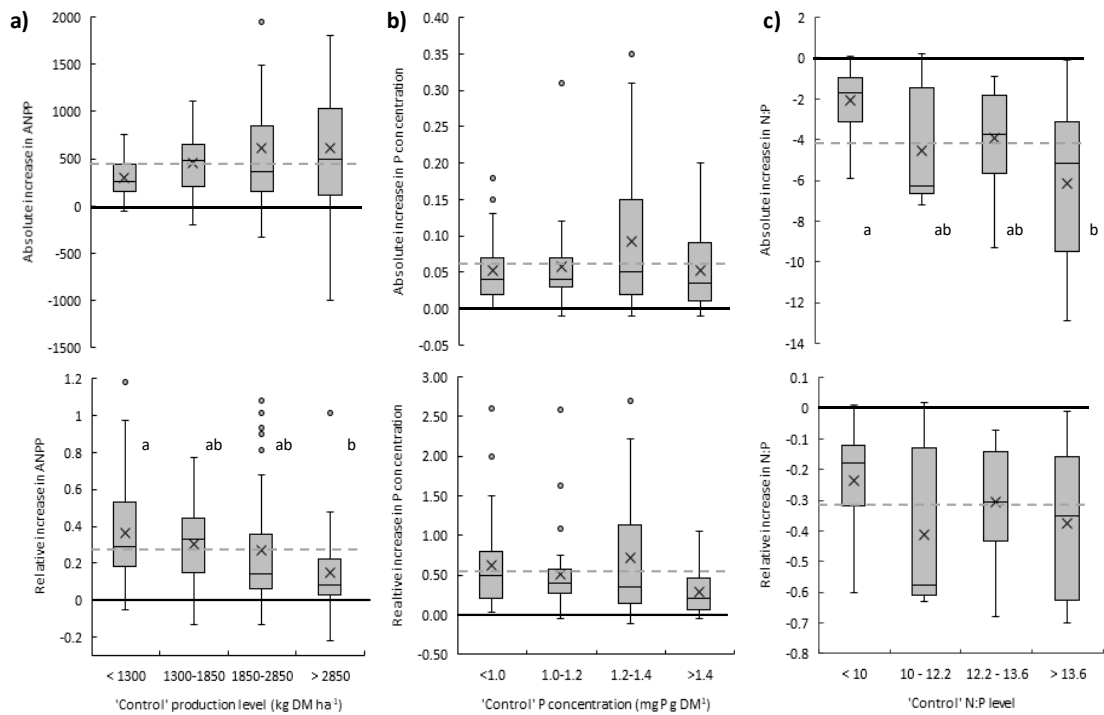


Figure 3. Absolute and relative effect of P fertilization on a) ANPP (DM basis), b) herbage P concentration and c) herbage N:P ratio through ‘Control’ non-fertilized categories for each variable. Box lines are percentile 0.25, 0.50 and 0.75; whiskers are 0.10 and 0.90 percentile. The dotted gray lines indicate the overall average effect. Letters indicate statistically differences (Fischer $p < 0.01$).

2.5.2. Relationship between the size of the response to P fertilization and ancillary variables

BRT results showed similar patterns in ANPP, herbage P concentration, and herbage N:P ratio: a first group of one or two variables represented more than 30% of relative contributions of predictor variables for BRT model, and a second group of 2 to 4 variables accounted for a further 15%. All other variables have very low weights. ‘Control’ (a non-fertilizer value and related with growth potential of each environment for ANPP or base line of nutritional status), soil pH, annual P addition rate, and AWC were the most important ancillary variables to explain BRT model

(Figure 4). The fitted functions for the 6 more relevant ancillary variables are shown in Figure 5, where it is possible to identify gradual trends and thresholds.

For ANPP, P fertilization had larger effects when soils had more than 140 mm of AWC, ANPP of unfertilized treatment was greater than 3500 kg DM ha⁻¹, soil pH was higher than 5.8, more than 75 kg P ha⁻¹ yr⁻¹ were applied, clay content was less than 35%, and proportion of species capable of mobilizing P was greater than 8% (Figure 5.a). For herbage P concentration, increases were greater when unfertilized treatment plants had P concentrations between 1.2 to 1.6 mg P g DM⁻¹, more than 100 kg P ha⁻¹ yr⁻¹ were applied, pH was higher than 6.2, clay content was above 35%, available soil P (Bray & Kurtz, 1945) was higher than 7.5 ppm, and the proportion of C₃ species was below 50% (Figure 5b). For herbage N:P ratio, P fertilization had more significant effects when soil pH was higher than 6.2, P rates were above 55 kg P ha⁻¹ yr⁻¹, and N:P of unfertilized treatment were greater than 12.5 (Figure 5c).

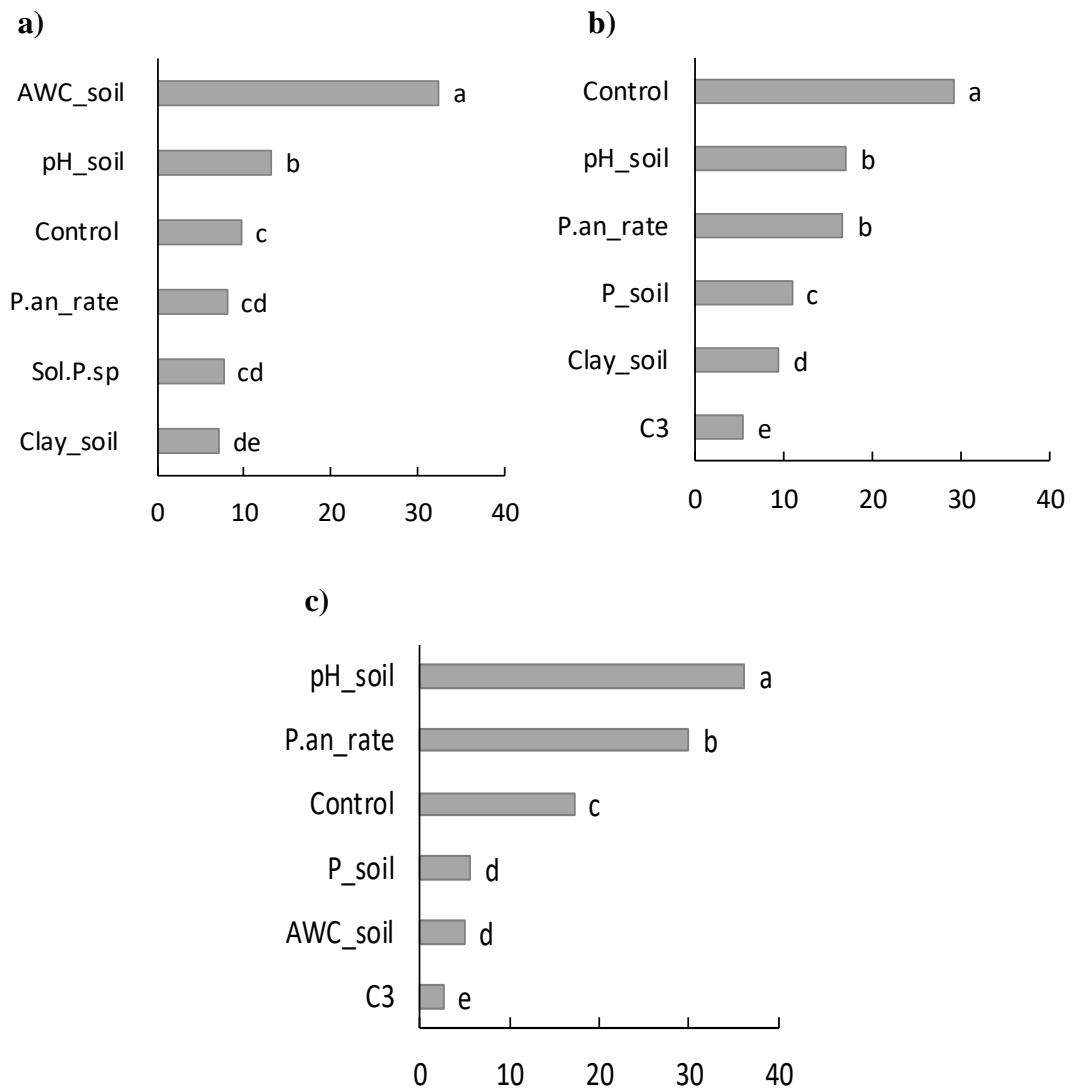
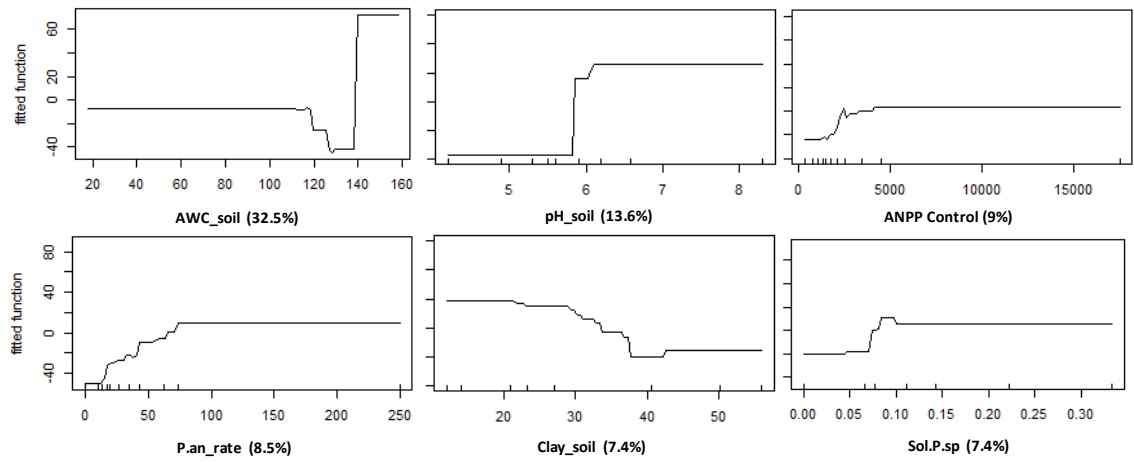
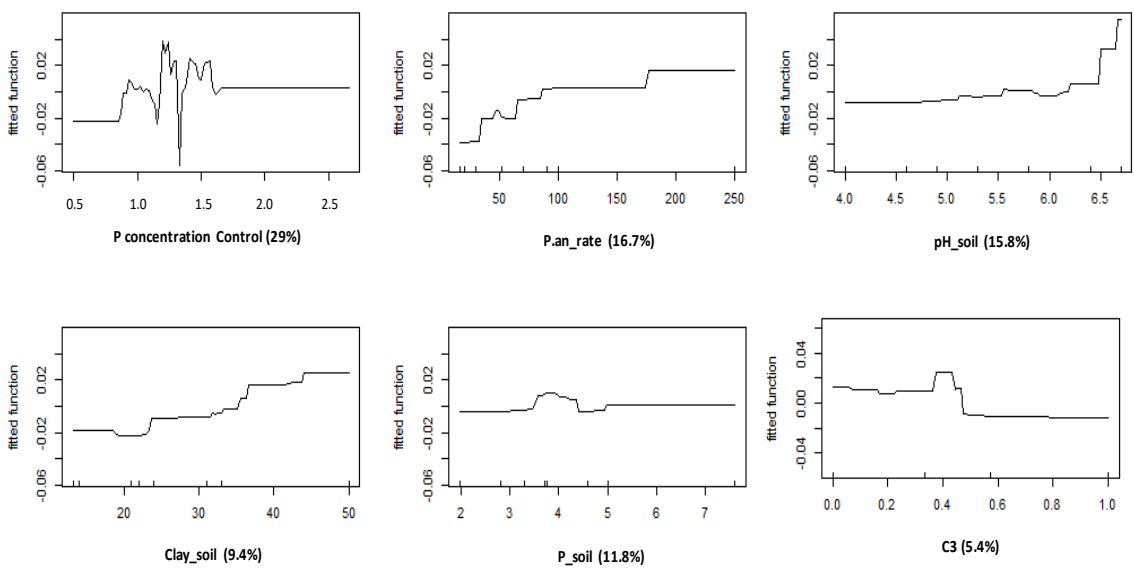


Figure 4. Relative influence of environmental and management variables on the response to P fertilization of a) ANPP (DM basis), b) herbage P concentration, and c) herbage N:P ratio. Letters indicate statistically differences (Fischer $p < 0.05$). (AWC_soil: soil available water capacity, pH_soil: soil pH, 'Control': non-Fertilized value, P.an_rate: P annual rate supply, Sol.P.sp: proportion of P mobilizing species, Clay_soil: proportion of clay on total soil granulometry, C₃: proportion of C₃ metabolism species, P_soil: available soil phosphorus by soil test)

a)



b)



c)

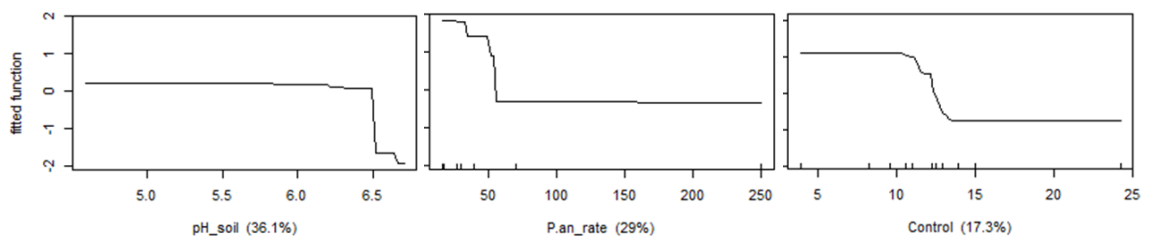


Figure 5. Fitted function from BRT analysis for environmental and management variables that showed the greatest relative influence on the response to P fertilization of a) ANPP (DM basis), b) herbage P concentration, and c) herbage N:P ratio.

Ancillary variables explained results between pair wise comparison by multiple lineal regression on P concentration and N:P ratio cases, but not for ANPP-DM (Table 4). In a midway situation is ANPP-FM, where unfertilized treatment values and plant functional types community composition are the main variables that explain this moderate adjust. No variable was associated with P fertilization response on ANPP-DM and the adjusted model explained no more than 5% of the variation. However, soil properties, like available P, pH, available water capacity (AWC) and annual P rate, are relevant to explain herbage P concentration and N:P ratio results (Table 4).

No difference response was detected between phosphorus fertilizer source (soluble or insoluble) for ANPP, herbage P concentration and herbage N:P ratio (data not shown). In the same way, no difference was detected on phosphorus fertilization response between earlier than more recent experiments neither on ANPP nor on P concentration. For N:P ratio a trend was observed to greater effects on more recent years (data not shown). Differences was detected for soil class on P concentration and N:P ratio, where Mollic Solonnet (SMo) on Pampa region, showed a bigger change than other soils, but not for ANPP (data not shown).

Table 4: Coefficient of determination (R^2) for simple linear regression of the response to P fertilization in ANPP, herbage P concentration and herbage N:P ratio against several ancillary variables. Variables shaded in grey were included on multiple regression analysis (Adjusted model).

Variable	ANPP-DM	ANPP-FM	P concentration	N:P
<i>Unfertilized control</i>				
ANPP	-	0.18**		
P concentration			-	
N:P ratio				0.27**
<i>Soil properties</i>				
P_soil	-	0.01	0.28**	0.35**
pH_soil	0.03	-	0.26**	0.30**
AWC_soil	0.01	0.03	0.03	0.26**
SOM	-	0.03	0.08*	-
Clay_soil	-	-	0.06*	0.08*
<i>Fertilizer management</i>				
P.an_rate	-	0.01	0.34**	0.50**
P.acc_rate	-	0.02	-	-
<i>Species community functional groups</i>				
C ₃	0.02	0.30**	0.06*	0.06
Leg	-	0.09*	0.03*	-
RCS	-	0.40**	0.02	0.06
Sol.P.sp	0.03	0.40**	-	-
Adjusted model	0.05*	0.55**	0.70**	0.81**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

2.6. DISCUSSION

The meta-analysis of 428 independent comparisons between P fertilized and unfertilized control plots, from 48 studies across Argentina, Brazil and Uruguay, provided little evidence of P limitation of ANPP in the southern south American grasslands. We observed infrequent and small increases in ANPP in response to P fertilization (Figure 2a), along with more frequent and larger increases in herbage P concentration (Figure 2c), whose magnitude was further closely related to initial soil and plant P status, pH, and P fertilization rate (Table 4). These responses indicate an ecosystem not limited by P to any great extent. In particular, the considerably larger average relative effect of P fertilization on herbage P concentration (55 %) than in ANPP (27 %) not found in plants or communities that are P-limited (Li, Niu, Yu, 2016), and could be interpreted as an indication of frequent luxury P consumption in the fertilized treatments.

Such a lack of response to P fertilizer –opposite to our hypothesis– occurred despite widely reported low available soil P (Bray & Kurtz, 1945) and low herbage P concentrations, which our database confirmed (Table 2). How come? Then we point out three non-mutually exclusive putative mechanisms.

First, ANPP is more limited by other factors, such as the availability of other nutrients or water. There was indeed a somewhat greater response to added P in environments that were intrinsically more productive, as measured by the ANPP of the unfertilized treatment (Figure 3 and 5a). Further, P supply (P_rate) was more correlated with increases in P concentration than increases in ANPP (Table 4, Figure 4 and 5). Herbage N:P ratios further support to this mechanism, pointing to nitrogen deficiency as a putative limitation. N:P ratios lower than 10-15 would indicate N limitation, while ratios above 20-25 would indicate P limitation (Güsewell, 2004). We observed generally low N:P ratios (90 % of data below 14; 65% below 10.5), which decreased even further in response to P fertilization. An independent dataset on N:P ratio of 262 herbage samples taken from Campos grasslands from Uruguay

(Laboratory for Animal Nutrition INIA “La Estanzuela”) has the same general pattern of N and P concentration found in the present meta-analysis, confirming that those values are representative of RPG (Figure 6). Less than 0.02% of the cases correspond to N:P ratios below 4, that could be indicating a physiological limit to accumulate P without N.

Overall, our results suggest that N could be the most limiting nutrient in these grasslands. The same trend is reported in others P fertilization studies: when P concentration increments had no effect on N concentration, as consequence there is a significant reduction on N:P ratio that strengthen the N limitation, a “luxury consumption” of P is also reported (Islam, Adams, 1999; Bennett, Adams, 2001; Li, Niu, Yu, 2016). These works demonstrate or suggest that below these N:P ratios.

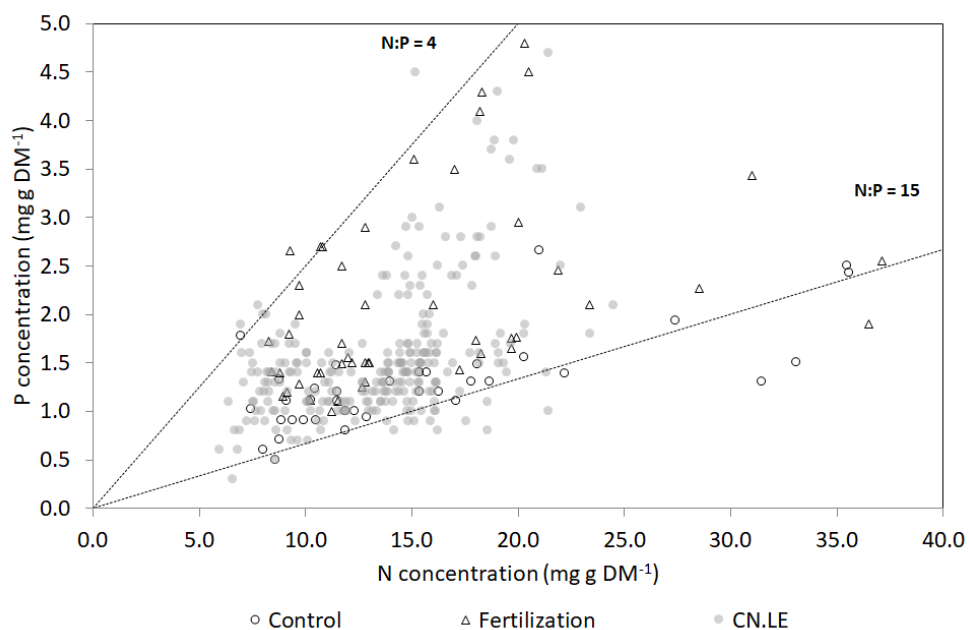


Figure 6. Relationship between herbage N and P concentration in natural grassland data used on meta-analysis with P fertilizer (open triangle) and without P fertilizer (open circle); data base of Laboratory of Animal Nutrition INIA LE (n=262) (grey circle).

A second putative mechanism involves the presence of diverse mechanisms for mining P. P fertilization response was related to pH levels, observing a threshold at pH of 6-6.5 for the three response variables, where increments are higher (Table 4, Figure 4 and 5). This may be related to lesser P adsorption by Al and Fe oxides, clay and carbonates above this level (Stevenson, 1986). Soil Ph levels are related with geological formations with regional patterns, where neutral and basic values are on southwest while low pH are more represented on northeast region. In the same way, P supply levels are correlated with the magnitude of fertilizer responses. P concentration and N:P ratio is significantly affected by the amount of $\text{kg P ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ applied, but not ANPP (Table 4). However, three response variables (ANPP, P concentration and N:P ratio) have a similar trend, showing an increase of the response while fertilization levels rise until a plateau (Figure 4 and 5). Both ancillary variables, P supply and pH levels, are affected P available for plants and magnitude of changes observed. Organic P was not particular considered though SOM showed limited effect on variables responses.

A third mechanism involves plant community adjusted and potential. Scarce relationship between available soil P and ANPP and limited relationship with P concentration, strengthen the idea that the real P availability for plants is not the same as the one that is extracted by chemical methods (Schneider, Cade-Menun, Lynch, Voroney, 2016) especially in the case of plants well adapted to very low soil P availability environments (Lambers, Hayes, Laliberté, Oliveira, Turner, 2015). Species community functional groups have less importance than soil characteristic variables but, the proportion of C_3 species is relevant to explain positive effect on P concentration, that is concordant with the capacity of the species community to uptake P, and possibility to transform it in biomass according with grater requirement for C_3 vs. C_4 plants (Morris, Fox, Jung', 1982). In this case, lower presence of C_3 species is associated with a greater increase on P concentration and no changes on ANPP. This response would be related to the fact that luxury consumption in C_4 grasses would start at lower levels of P compared to C_3 . Moreover the fact of a community composition based on P mobilizing species, species with generally low

leaf P concentration (Hayes, Turner, Lambers, Etienne, 2014) which cannot downregulate P uptake (de Campos, Pearse, Oliveira, Lambers, 2013), imply that these communities with no response to P addition in spite of the low soil available P levels, reach their supply of P by mining non available soil P sources.

Thus, for this ecosystem it is not clear that N and P deficiencies appear to be at similar level as proposed (Elser et al., 2007), because many pair wise comparisons have low or null response to P added. Rather, the southern south American grasslands appear to be functioning intermediately between semi-arid grasslands, in which water is the major driver of ANPP (Snyman, 2002), and wetlands or humid grasslands, where growth is limited by P availability or the speed at which P is extracted from various soil pools (Bélanger et al., 2017). The analysis provided some evidence of greater responses to P fertilizer in environments that were intrinsically more productive.

2.6.1. Practical Implications

P fertilization on these natural grasslands appears as a technology with little productive impact and potentially important environmental risks. P fertilization is expected to have a moderate impact only in deep, neutral to alkaline pH soils of high productivity sites. Increments on P future demand to maintain and achieve prospective demand, consider a generic model that not concord with RPG and their dynamic (Sattari et al., 2016). P deficiency may be induced if N becomes more available (e.g. via fertilizers or BNF).

Improved herbage P concentration brought by P fertilization may benefit grazing animal health and productivity. Indeed, P fertilization could be a practical option to increment P concentration in forage as way to reduce P limitation on animal nutrition. But, for Campos grasslands the concept of soil–plant–animal interrelationship has a limited evidence-base and is also affected by soil type and seasons of the year (dos Santos, Alfaya, Díaz, da Silva, 2010).

In conclusion primary productivity on the Rio de la Plata grasslands is not limited by P availability to any great extent. This is supported by, first, the infrequent increases in ANPP in response to P fertilization, whose relatively small magnitude (average size effect 455 kg DM ha⁻¹year⁻¹) was not associated to any variable related to P dynamics, and second, by the more frequent and larger changes observed in herbage P concentration (average size effect 0.6 mg P g DM⁻¹) and N:P ratio (average size effect -4.05 g N/g P), which were closely related to soil pH, P fertilization rate, and soil and plant P status in unfertilized treatments.

2.7. REFERENCES

- Allen, V. G., Batello, C., Berretta, E. J., Hodgson, J., Kothmann, M., Li, X., ... Sanderson, M. (2011). An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass and Forage Science*, 66, 2–28. doi:10.1111/j.1365-2494.2010.00780.x
- Andrade, B. O., Koch, C., Boldrini, I. I., Vélez-Martin, E., Hasenack, H., Hermann, J. M., ... Overbeck, G. E. (2015). Grassland degradation and restoration: A conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. *Natureza & Conservacao*, 13(2), 95–104. doi:10.1016/j.ncon.2015.08.002
- Andrade, B. O., Bonilha, C., Ferreira, P., Boldrini, I., & Overbeck, G. (2016). Highland grasslands at the southern tip of the atlantic forest biome: Management options and conservation challenges. *Oecologia Australis*, 20(2): 37-61. doi:10.4257/oeco.2016.2002.04
- Andrade, B. O., Marchesi, E., Burkart, S., Setubal, R. B., Lezama, F., Perelman, S., ... Boldrini, I. I. (2018). Vascular plant species richness and distribution in the Río de la Plata grasslands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(3), 250–256. doi:10.1093/botlinnean/boy063
- Avolio, M., Koerner, S., La Pierre, K., Wilcox, K., Wilson, G., Smith, M., & Collins, S. (2014). Changes in plant community composition, not diversity, during a decade of nitrogen and phosphorus additions drive above-ground productivity in a tallgrass prairie. *Journal of Ecology*, 102, 1649–1660. doi: 10.1111/1365-2745.12312

- Aydin, I., & Uzun, F. (2005). Nitrogen and phosphorus fertilization of rangelands affects yield, forage quality and the botanical composition. *European Journal of Agronomy*, 23, 8–14. doi:10.1016/j.eja.2004.08.001
- Baeza, S. (2016). *El Uso/Cobertura del suelo en Uruguay y los Pastizales del Río de la Plata: caracterización, análisis de sus cambios a lo largo del tiempo e impactos sobre el funcionamiento ecosistémico*. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Bélanger, G., Ziadi, N., Lajeunesse, J., Jouany, C., Virkajarvi, P., Sinaj, S., & Nyiraneza, J. (2017). Shoot growth and phosphorus–nitrogen relationship of grassland swards in response to mineral phosphorus fertilization. *Field Crops Research*, 204, 31-41. doi: 10.1016/j.fcr.2016.12.006
- Bennett, L., & Adams, M. (2001). Response of a perennial grassland to nitrogen and phosphorus additions in sub-tropical, semi-arid Australia. *Journal of Arid Environments*, 48, 289-308. doi:10.1006/jare.2000.0759
- Bilenca, D., & Miñarro, F. (2004.). *Identificación de áreas valiosas de pastizal (AVPs) en las pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil*. Buenos Aires, Argentina: Fundación Vida Silvestre Argentina.
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*, 59(1), 39-46.
- Carámbula, M. (1978). Producción de Pasturas. In MAP - CIAAB (Ed.), *Paturas IV* (micelanea 18, pp. 7–10). Montevideo, Uruguay: CIAAB.
- Cruz, P., De Quadros, F., Theau, J., Frizzo, A., Jouany, C., Duru, M., & Carvalho, P. (2010). Leaf traits as functional descriptors of the intensity of continuous

grazing in native grasslands in the South of Brazil. *Rangeland Ecology and Management*, 63(3):350-358. doi: 10.2111/08-016.1

Darwich, N. A. (1983). Niveles de fósforo asimilable en los suelos pampeanos. IDIA, Informativo de Investigaciones Agrícolas.

de Campos, M. C., Pearse, S. J., Oliveira, R. S., & Lambers, H. (2013).

Downregulation of net phosphorus-uptake capacity is inversely related to leaf phosphorus-resorption proficiency in four species from a phosphorus-impooverished environment. *Annals of Botany*, 111, 445–454.

doi:10.1093/aob/mcs299

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C.W., (2015). InfoStat versión 2015 [computer program] Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

dos Santos, B. R. C., Alfaya, H., Dias, A. E. A., & da Silva, J. B. (2010). Correlation of the phosphorus in the system soil-plant-animal in natural pasture in the region of Campanha-RS. *Archivos de Zootecnia*, 59(228), 487-497.

Duru, M., & Ducrocq, H. (1997). A nitrogen and phosphorus herbage nutrient index as a tool for assessing the effect of N and P supply on the dry matter yield of permanent pastures. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 47, 59-69.

Elith, J., & Leathwick, J. (2017). Boosted Regression Trees for ecological modeling. *R documentation*. Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/dismo/vignettes/brt.pdf>.

Elith, J., Leathwick, J., & Hastie, T. (2008). A working guide to boosted regression trees. *Journal of Animal Ecology*, 77(4), 802-813. doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01390.x

- Elser, J., Bracken, M., Cleland, E., Gruner, D., Harpole, W., Hillebrand, H., . . . Smith, J. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, *10*(12), 1135-1142. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x
- Gardi, C., Angelini, M., Barceló, S., Comerma, J., Cruz Gaistardo, C., Encina Rojas, A., . . . Muñiz Ugarte O. (2014). *Atlas de suelos de America Latina y el Caribe*. Luxembourg: Comisión Europea, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2014. doi: 10.2788/37334
- Gilbert, J., Gowing, D., & Wallace, H. (2009). Available soil phosphorus in semi-natural grasslands: Assessment methods and community tolerances. *Biological Conservation*, *142*(5), 1074-1083. doi: 10.1016/j.biocon.2009.01.018
- Gurevitch, J., & Hedges, L. V. (1999). Statistical issues in ecological meta-analyses. *Ecology*, *80*(4), 1142-1149. doi: 10.1890/0012-9658(1999)080[1142:SIHEMA]2.0.CO;2
- Güsewell, S. (2004). N:P ratios in terrestrial plants: Variation and functional significance. *New Phytologist*, *164*(2), 243-266. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01192.x
- Hayes, P., Turner, B. L., Lambers, H., & Etienne, L. (2014). Foliar nutrient concentrations and resorption efficiency in plants of contrasting nutrient-acquisition strategies along a 2-million-year dune chronosequence. *Journal of Ecology*, *102*, 396–410. doi: 10.1111/1365-2745.12196
- Haygarth, P. M. (1998). Phosphorus budgets for two contrasting grassland farming systems in the UK. *Soil use and Management*, *14*, 160-167. doi: 10.1111/j.1475-2743.1998.tb00635.x

- Hernández, J., Otegui, O., & Zamalvide, J. P. (1995). Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos del Uruguay (No. 43). Universidad de la República, Facultad de Agronomía.
- Hoglund, K., Miller, H. W., & Hafenrichter, A. L. (1952). Application of fertilizers to aid conservation on annual forage range. *Journal of Range Management*, 5(2), 55-61.
- Islam, M., & Adams, M. (1999). Mineral content and nutritive value of native grasses and the response to added phosphorus in a Pilbara rangeland. *Tropical Grassland*, 33(4), 193-200.
- Jaurena, M., Lezama, F., & Cruz, P. (2012). Perennial grasses traits as functional markers of grazing intensity in basaltic grasslands of Uruguay. *Chilean journal of agricultural research*, 72(4), 541-549.
- Jouany, C., Cruz, P., Daufresne, T., & Duru, M. (2011). Biological phosphorus cycling in grasslands: interactions with nitrogen. In *Phosphorus in Action* (pp. 275-294). Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-15271-9_11
- Koerselman, W., & Meuleman, A. F. (1996). The vegetation N: P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of applied Ecology*, 33(6), 1441-1450.
- Lambers, H., Hayes, P., Laliberté, E., Oliveira, R., & Turner, B. (2015). Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. *Trends in Plant Science*, 20(2), 83-90. doi: 10.1016/j.tplants.2014.10.007
- Lambers, H., Raven, J. A., Shaver, G. R., & Smith, S. E. (2008). Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(3), 95-103. doi: 10.1016/j.tree.2007.10.008

- Li, Y., Niu, S., & Yu, G. (2016). Aggravated phosphorus limitation on biomass production under increasing nitrogen loading: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 22(2), 934-943. doi: 10.1111/gcb.13125
- Macedo, W. (1984). Levantamento de reconhecimento dos solos do município de Bage , RS. *Embrapa Pecuária Sul-Documentos* (INFOTECA-E).
- Mallarino, A. P., Sawyer, J. E., & Barnhart, S. K. (2013). A General Guide for Crop Nutrient and Limestone Recommendations in Iowa. *Extension and Outreach Publications*. 82.
- MGAP-DIEA. (2013). Censo General Agropecuario 2011. Montevideo, Uruguay: MGAP-DIEA.
- Modernel, P., Rossing, W., Corbeels, M., Dogliotti, S., Picasso, V., & Tiftonell, P. (2016). Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters*, 11(11), 113002. doi: 10.1088/1748-9326/11/11/113002
- Morris, R., Fox, R., & Jung', G. (1982). Growth, P Uptake, and Quality of Warm and Cool-Season Grasses on a Low Available P Soil 1. *Agronomy Journal*, 74(1), 125-129. doi:10.2134/agronj1982.00021962007400010032x
- Overbeck, G., Müller, S., Fidelis, A., Pfadenhauer, J., Pillar, V., Blanco, C., . . . Forneck, E. (2007). Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 9(2), 101-116.
- Oyarzabal, M., Clavijo, J., Oakley, L., Biganzoli, F., Tognetti, P., Barberis, I., . . . León, R. (2018). Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral*, 28(1), 040-063. doi:10.25260/EA.18.28.1.0.399

- Polat, T., Bükün, B., & Okant, M. (2007). Dose response effect of nitrogen and phosphorus on forage quality, yield and economic return of rangelands. *Pakistan Journal of Botany*, 39(3): 807-816.
- Sattari, S., Bouwman, A., Martinez Rodríguez, R., Beusen, A., & Van Ittersum, M. (2016). Negative global phosphorus budgets challenge sustainable intensification of grasslands. *Nature Communications*, 7, 10696. doi: 10.1038/ncomms10696
- Schneider, K., Cade-Menun, B., Lynch, D., & Voroney, R. (2016). Soil Phosphorus Forms from Organic and Conventional Forage Fields. *Soil Science Society of America Journal*, 80(2), 328-340. doi: 10.2136/sssaj2015.09.0340
- Sharpley, A., Bergström, L., Aronsson, H., Bechmann, M., Bolster, C., Börling, K., . . . Withers, P. (2015). Future agriculture with minimized phosphorus losses to waters: Research needs and direction. *Ambio*, 44(2), 163-179. doi: 10.1007/s13280-014-0612-x
- Snyman, H. (2002). Short-term response of rangeland botanical composition and productivity to fertilization (N and P) in a semi-arid climate of South Africa. *Journal of Arid Environments*, 50(1), 167-183. doi: 10.1006/jare.2001.0858
- Stevenson, F. J. (1986). Carbon balance of the soil and role of organic matter in soil fertility. *Cycles of Soil-Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulphur, Micro-nutrients*. John Wiley and Sons, 45-77.
- Trindade, J., da Rocha, D. S., & Volk, L. D. (2018). Uso da terra no Rio Grande do Sul: ano de 2017. *Embrapa Pecuária Sul-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)*.

- Ungerfeld, E. (1998). Factores que afectan el contenido de minerales en pasturas naturales y el estado nutricional de vacunos y ovinos en Uruguay: Revisión Bibliográfica. INIA, Tacuarembó, Uruguay.
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C., & Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157, 423-447. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x
- Vergutz, L., Manzoni, S., Porporato, A., Novais, R. F., & Jackson, R. (2012). Global resorption efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial plants. *Ecological Monographs*, 82(2), 205–220. doi: 10.1890/11-0416.1
- Viglizzo, E., & Jobbágy, E. G. (Eds.). (2010). *Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental*. Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Westermann, D.T. (2005) Plant analyses and interpretation. In: Sims, J.T. and Sharpley, A.N., (eds.) *Phosphorus: Agriculture and the Environment*. *Agronomy Monograph*, No. 46. pp. 415-436. Madison, WI. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.

2.8. SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Reference, Experimental Years, Latitude, Longitude, Soil type, P rate, number of pair wise comparisons (N) used in the meta-analysis and Data set.

Reference [¥]	Exp Years	Lat.	Long.	Soil type [†]	P rate	N	Dataset
Acevedo, Bonilla, Mas & Vidiella (1973)	1970-72	-34.60221°	-54.46234°	LVct (Haplic Luvisols Cut.)	35	3	2
Acevedo, Bonilla, Mas & Vidiella (1973)	1971-72	-33.38692° -33.83817°	-53.84153° -53.52082°	PLmo (Mollic Planosols), GLha	35	4	2
Acevedo, Bonilla, Mas & Vidiella (1973)	1970-72	-34.50140°	-54.29404°	PHlv (Luvic Phaeozems)	17-35	3	2
Acevedo, Bonilla, Mas & Vidiella (1973)	1971-72	-34.08428°	-53.82350°	GLha(Glaysols)	17-35	2	2
Acevedo, Bonilla, Mas & Vidiella (1973)	1970-72	-33.26071°	-54.39790°	PHlv	16-33	56	2
Amorin & Gonzalez (1986)	1983	-33.8693°	-55.57420°	PHha (Haplic Phaeozems)	17-70	4.16.16	1.3.4
Arocena, Castro, Formoso & Lima (1973)	1970-72	-31.74273° -32.22778°	-55.97931° -54.93798°	LVct, PHvr(Vertic Phaeozems)	22-157	12	2
Bermúdez & Ayala (2005)	1992-94	-33.25306°	-54.49286°	PHlv	87	3	1
Bottaro & Zabala (1973)	1971	-31.38678° -32.42864°	-57.39247° -58.05308°	LPli, PHvr, LVct, PHha	70-140	8	1
Burgos de Anda (1974)	1971	-32.35612°	-54.44181°	PHvr, PHlv	70-140	4	1
Cardozo & Reyno [¥]	2015	-33.25306°	-54.49286°	PHlv	44	1	1
Cardozo & Reyno [¥]	2014-16	-34.77393°	-55.16311°	PHlv	20-44	4	1

Cardozo, Quiñones & Jaurena (2018)	2014	-34.32165°	-54.58104°	CMle (Leptic Cambisols)	44	1	1
Castells (1974)	1971	-31.49843°	-57.52640°	LPli, PHvr	70-140	8	1
Costa & García (1997)	1993-94	-37.75853°	-58.30397°	SNmo (Mollic Solonetz)	22-87	4	1
Cuadro & Reyno [¥]	2014-15	-32.02586°	-57.16185°	LPli (Lithic Leptisols)	20-44	6	1
Fedriego (2011)	2010	-30.58221°	-55.77251°	LPeu (Eutric Leptosols)	39	1	1
Ginzo, Collantes & Caso (1982)	1976-78	-35.40409°	-57.31618°	VReu (Haplic Vertisols Eutric)	42	3	1
Gonzalez, Moreno & Svartz (1995)	1993	-29.19749°	-58.03904°	PHlv	80	1	3
Jaurena, Giorello, Perez Gomar, Do Carmo & Cardozo (2014)	2011-14	-31.91197°	-56.22752°	PHvr	35	8	1
Kuhn, Boffa, Massa & Pautasso (2008)	2006	-31.34864°	-59.40523°	LVcc (Calcic Luvisols)	9- 17	2	1
Macedo Goncalves & Girardi-Deiro (1980)	1980	-31.34981°	-54.01140°	PLlv (Luvic Planosols)	22-65	3	1
Mas [¥]	1971-77	-33.06506°	-54.35871°	PHha	6-73	30	1
Mas, Bermúdez & Ayala (1997)	1978-87	-33.06506°	-54.35871°	PHha	13	10	1
Mas, Bermúdez & Ayala (1997)	1983-90	-33.06727°	-54.17731°	PHlv	13	8	1
Noailles, et al. (2004)	1988-89	-35.19864°	-58.37679°	PHlv	30	2	1
Oliveira, de (2012)	2010	-31.41007°	-53.56342°	LPeu, ACcr (Chromic Acrisols)	44	4.36	1.3
Pallares & Pizzio (1994)	1969	-29.19749°	-58.03904°	PHlv	9-44	5	1
Pizzio, Delfino, Rivero & Fernández (2004)	2000-01			PHlv,	30	24	3

Porta, Hack, Tomei, Ciotti & Castelán (2008)	2004	-28.07808°	-56.01388°	FRro (Rhodic Ferralsols)	30-90	3.30	1.3
Prestes (2015)	2010-13	-28.02622°	-50.41379°	CMdy (Distric Cambisols)	15-61	12	1
Pueyo, Iacopini, Rey, Fonseca & Bruns (2005)	2005	-30.38215°	-58.76251°	LVcc	5 -10	2.1.1	1.3.4
Reyno †	2013-15	-32.02586°	-57.16185°	LPli, PHvr	26	6	1
Rodríguez, Jacobo, Scardaoni & Deregibus (2007)	1999	-36.27424°	-60.66817°	SNmo	29-66	2	1
Rubio, Taboada, Lavado, Rimski-Korsakov & Zubillaga (1997)	1992-93	-35.54764°	-58.22169°	PHlv	16	2.6.12	1.3.4
Rubio, Gutierrez Boem & Lavado (2010)	-	-	-	SNmo	30	8.16	3.4
Sallis Viéga (1997)	1994	-31.80141°	-52.51617°	PLlv	39	1.1.2	1.3.4
Semmartin, Oyarzabal, Loreti & Oesterheld (2007)	1997	-36.26000°	-58.27000°	SNmo	250	1.16.16	1.3.4
Vidiella (1972)	1968-70	-33.38692° -33.83817°	-53.84153° -53.52082°	PLmo, GLha	20-120	24	2
Range	1968-2016	-28.02622° -37.75853°	-50.41379° -60.66817°	16 soil types	5-250		

‡= unpublished data

†= Gardi, C., *et al.* 2014. Atlas de suelos de América Latina y el Caribe.

*Data set 1= ANPP-DM, 2= ANPP-FM, 3= P concentration and 4= N:P ratio.

Table S2: List of paper and report used on Meta-analysis

- Acevedo, A., Bonilla, O., Mas, C. & Vidiella, J. C. (1973). Proyecto Regional en la Zona del Este. In MGA-CIAAB, *Pasturas I*, (pp. 24-93). La Estanzuela: MGA-CIAAB
- Amorin, J. L. & Gonzalez, F. (1986) Evaluación de fuentes por nivel de fósforo en Campo Natural y con introducción de leguminosas, evaluación de distintas leguminosas con tres métodos de introducción en el tapiz. (Tesis pregrado) Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Arocena, M., Castro, E., Formoso, F. & Lima, G. (1973). Proyecto Regional en la Zona Noreste. In MGA-CIAAB, *Pasturas II*, (pp. 32-74). La Estanzuela: MGA-CIAAB
- Bermúdez, R. & Ayala, W. (2005) Producción de forraje de un Campo Natural de la zona de Lomadas del Este. In D. Risso, W. Ayala, R. Bermúdez E. Berretta, Seminario de actualización técnica en manejo de Campo Natural (Serie Técnica N.º 151, pp.33-40), Montevideo, Uruguay: INIA.
- Bottaro, C. & Zabala, F. (1973). *Efecto de la Fertilización mineral NPK en la producción de forraje de algunas pasturas naturales del Uruguay*. (Tesis pregrado) Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Burgos de Anda, A. (1974). *Efecto de la Fertilización mineral NP en la producción de forraje de Campo Natural*. (Tesis pregrado) Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Cardozo, G., Quiñones, A. & Jaurena, M. (marzo, 2018) Impacto de la fertilización fosfatada en una comunidad con presencia de leguminosas nativas. [Resumen]. In G. Brito (Presidencia) *CONGRESO ASOCIACIÓN URUGUAYA DE PRODUCCIÓN ANIMAL*, AUPA. Tacuarembó, Uruguay.
- Castells, D. (1974). *Fertilización de Campo Natural*. (Tesis pregrado) Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

- Costa, J. L. & García, F. O. (1997). Respuesta de un Pastizal Natural a la Fertilización con Fosforo y Nitrógeno en un Natracuol. RIA, INTA, Argentina, 28(2), 31–39.
- Fedriego, J. K. (2011). *Diferimento e fertilização de pastagem natural em neossolo de basalto na Campanha do Rio Grande do Sul*. (Tesis Mestrado Zootecnia). UFRGS, Brasil.
- Ginzo, H. D., Collantes, M., Caso, O. H. (1982). Fertilization of a native grassland in the “Depresión del Río Salado”, Province of Buenos Aires: herbage dry matter accumulation and botanical composition. *J. Range Management*, 35, 35–39.
doi:10.2307/3898513
- Gonzalez, M., Moreno, G. & Svartz, H. (1996). Cambios en los niveles de K y P de suelos fertilizados después de 12 años de pastoreo continuo. Efectos sobre la pastura. *Rev. Facultad de Agronomía*, 16(1-2): 1-6.
- Jaurena, M., Giorello, D., Gomar, E. P., Carmo, M. D. & Cardozo, G. (2013). Short-term effects of the interaction irrigation-fertilization in the production and composition of a natural field of basalt in Uruguay. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa*, 22 (Suplemento 2 Tomo II), 35-42
- Kuhn, J. M., Boffa, S., Massa, E. & Pautasso, J.M. (2008). Fertilización de pastizal natural: respuesta al agregado de fósforo. Ensayo en campo de productores. Paraná. 10 p.
- Macedo, W., Goncalves, J. O. N. & Girardi-Deiro, A. M. (1980). Melhoramenro do Campo Natural com fertilizantes e leguminosas “Fase Inicial.” *EMBRAPA-UEPAE*. Bagé, RS, Brasil. 33p.
- Mas, C., Bermúdez, R. & Ayala, W. (1997). Crecimiento de las pasturas naturales en dos suelos de la región Este. In: Carámbula, M.; Vaz Martins, D.; Indarte, E. (Eds.). *Pasturas y producción animal en áreas de ganadería extensiva*. 2a. reimpresión. (INIA Serie Técnica ; 13). (pp.59-67) Montevideo (Uruguay): INIA.
- Noailles Bosch, E. E., Piantanida, N. A., Peticari, A., Donato de Cobo, L., Gómez, L. A., Zaneli, M., ... Pittaluga, A. (2004). Resultados de fertilizaciones e intersiembra en suelos con aptitud ganadera. INTA. Argentina. 8 p.

- Oliveira, L. B. de. 2012. Dinâmica do fósforo em ecossistema de pastagem natural submetido à aplicação de fontes de fosfato. Dissertação, Mestrado Zootecnia. UFSM, RS, Brasil. 86 p.
- Pallarés R. O. & Pizzio, R. M. (1994). Experiencias de fertilización de pasturas naturales en el centro-sur de Corrientes. In: Berretta, E.J. (Ed.). *Reunión del Grupo Técnico Regional del Cono Sur en mejoramiento y utilización de los recursos forrajeros del área tropical y subtropical, Grupos Campos*, 14., 1994, Termas del Arapey, Salto, Uruguay. Anales. Montevideo (Uruguay): INIA, 1998. p. 109-118 (INIA Serie Técnica; 94)
- Pizzio, R. M., Delfino, D., Rivero, L. & Fernández, J. G. (2005). Mejoramiento de Campo Natural en el departamento Curuzú Cuatiá. Noticias y Comentarios N° 399, INTA Mercedes, Corrientes, Argentina. 7 p.
- Porta, M., Hack, C. M., Tomei, C., Ciotti, E. M. & Castelán, M. E. (2008). Producción de materia seca y fósforo foliar en un pastizal del nordeste de la provincia de Corrientes. *AGROTECNICA*, 18, 3–5.
- Prestes, N. E. (2015). *Calagem, adubação e introdução de espécies em pastagem natural no planalto catarinense*. (Tese de Doutorado). UESC, Lages, SC. Brasil.
- Pueyo, J., Iacopini, M. L., Rey, R. M., Fonseca, J. & Bruns, J. (2005). fertilización de un pastizal natural del noreste de Entre Ríos. Hoja informativa. INTA Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina. 2 p.
- Rodríguez, A. M., Jacobo, E. J., Scardaoni, P. & Deregibus, V. A. (2007). Effect of Phosphate Fertilization on Flooding Pampa Grasslands (Argentina). *Rangeland Ecology and Management*, 60 (September), 471–478. doi:10.2111/1551-5028(2007)60[471:EOPFOF]2.0.CO;2
- Rubio, G., Gutierrez Boem, F. H. & Lavado, R. S. (2010). Responses of C3 and C4 grasses to application of nitrogen and phosphorus fertilizer at two dates in the spring. *Grass and Forage Science*, 65(1), 102–109. doi:10.1111/j.1365-2494.2009.00728.x

- Rubio, G., Taboada, M., Lavado, R. S., Rimski-Korsakov, H. & Zubillaga, M. S. (1997). Acumulación de biomasa, nitrógeno y fósforo en un pastizal natural fertilizado de la pampa deprimida. *Ciencia Del Suelo*. 15: 48-50,
http://www.suelos.org.ar/publicaciones/Vol_15n1/Rubio.pdf
- Sallis Viéga M. G.(1997) *Efeitos de diferentes macronutrientes minerais e calcário na avaliação do potencial de produção e qualidade do feno de ampo natural de planossolo*. (Tesis Mestrado). UFPel, Pelotas, RS, Brasil.
- Semmartin, M., Oyarzabal, M., Loreti, J., Oesterheld, M. (2007). Controls of primary productivity and nutrient cycling in a temperate grassland with year-round production. *Austral Ecology*, 32(4), 416–428. doi:10.1111/j.1442-9993.2007.01706.x
- Vidiella, J. C. (1972) *Evaluación de métodos de mejoramiento de campo natural y su respuesta a la fertilización fosfatada*. (Tesis pregrado) Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Table S3: List of paper and report used for associated variables

Aragón, M. (2012). Análisis de los resultados de la producción forrajera en campos naturales en el área de Verónica, Cuenca del Salado, Buenos Aires, medidos a través de la biomasa para su aprovechamiento en rodeos de cría. Universidad Católica Argentina. <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/analisis-resultados-produccion-forrajera-veronica.pdf> [Fecha de consulta: 21/2/2019]

Bortolon, L. (2005). *Métodos de avaliação da disponibilidade de nutrientes para as plantas em solos do Rio Grande do Sul.*(Tesis Mestrado) UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Bortoluzzi, M. P., Heldwein, A. B., Trentin, R., Lucas, D. D. P., Righi, E. Z. & Leonardi, M. (2017). Risk of water surplus in soybean crop on haplic planosol soil in the Central Depression of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Rural*, 47(2). doi: 10.1590/0103-8478cr20160170

Cardoso, C. D. V. (2005). *Probabilidade de ocorrência de deficiência hídrica nos solos da região central do estado do Rio Grande do Sul.*(Tese de Doutorado) UFSM, Santa María, RS, Brasil.

da Silveira, B. G., Borba, I. E.& Rodríguez Palma, R. (2013). *Efecto de medidas de manejo del campo natural sobre el secuestro de carbono en la materia orgánica del suelo.* Programa de Apoyo a la Investigación estudiantil. Salto, Uruguay: Universidad de la Republica.

Escobar, E. H., Ligier, H. D. & Matteio, H. R. (1990). Atlas de Suelos de la República Argentina. escala 1:500.000 y 1:1.000.000. Castelar, Buenos Aires: Centro de Investigaciones de Recursos Naturales, INTA.

Falasca, S. L., Lamas, M., Ulberich, A. & Bernabé, M. (1999). Características Diagnósticas del Agua Útil de los Horizontes Superficiales de los Suelos de la Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Revista Geográfica*, 125(125), 113–126. <http://www.jstor.org/stable/40992762>

- Falasca, S. L. & Ulberich, A. (2006). El agua disponible de los suelos del sudeste bonaerense, República Argentina. *Revista Geográfica*, 140, 7–17.
- Falasca, S. L., Ulberich, A. & Lamas, M. (2007). Constantes hidrológicas edáficas en la región subhúmeda- húmeda y húmeda oriental de la República Argentina. *Revista Geográfica*, 142, 89–109.
- Fernández, R., Rodríguez Aspillaga, F., Lupin, A., López, E., Pessutti, R., Crechi, E., ... Cortez, P. (2000). Respuesta del *Pinus taeda* y la *Araucaria angustifoli* a la adición de N, P y K en la implantación. *Actas SILVOARGENTINA*, 1, 10.
doi:10.15446/dyna.v84n202.61916
- Hernández, J. & Zamalvide, J. P. (1998). Procesos de retención de fosforo por los suelos evaluados a través de parámetros de suelo y planta. *Agrociencia* (Montevideo), 1(2), 48–63.
- Karlovsy, J. (1972). Uruguay: fertilidad de suelos. Informe preparado para el Gobierno del Uruguay por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. (Informe Técnico 1, 72 p) Roma: FAO.
- Lavado, R. S. & Taboada, M. A. (1985). Influencia del pastoreo sobre algunas propiedades químicas de un Natrucol de la Pampa Deprimida. *Ciencia del Suelo*, 3(1–2), 102–108.
- Macedo, W., Gonçalves, J. O. N. & Girardi-Deiro. (1985). Melhoramento de pastagem natural com fosfatos e introdução de leguminosas em solo da fronteira oeste do Rio Grande do Sul. *R. Bras. Ci. Solo*, 9(I), 231–235.
- MAP (Ministerio de Agricultura y Pesca) Dirección de Suelos. (1976). Carta de reconocimiento de suelos del Uruguay. tomo III, Apéndice parte I y II. Descripciones, datos físicos y químicos de los suelos dominantes. Montevideo, Uruguay: MAP.
- Merotto Junior, A., Luiz de Almeida, M. & Fuchs, O. (1997). Aumento no rendimento de grãos de milho através do aumento da populacao de plantas. *Ciência Rural*, 27(4), 549–554.

- Molfino, J. H. (2009). Estimación del Agua Disponible en los grupos CONEAT, Metodología empleada. MGAP (DIRENARE)–INIA (GRAS).
- Rozas, H. R. S., Echeverría, H. E. & Angelini, H. P. (2011). Niveles de carbono orgánico y pH en suelos agrícolas de las regiones pampeana y extra pampeana Argentina. *Ciencia del Suelo*, 29(1), 29–37.
- Siewerdt, L., Nunes, A. & Junior, P. S. (1995). Efeito da adubação nitrogenada na produção e qualidade da matéria seca de um campo natural de planossolo no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, 1(3), 157–162. doi:10.1590/S1516-35982001000300007
- Silveira, D., Hernández, J., Cadenazzi, M., Del Pino, A., Zanoniani, R. & Boggiano, P. (2015). Efecto de la fertilización fosfatada sobre la composición química de *Lotus tenuis* y *Trifolium repens*. *Agrociencia Uruguay*, 19(2), 49–58.
- Streck, E. V., Kämpf, N., Dalmolin, R. S. D., Klamt, E., Nascimento, P. D., Schneider, P., ... Pinto, L. F. S. (2008). *Solos do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFRGS, EMATER/RS-ASCAR.

Perfiles de suelo:

- INTA, E. E. A. C. (n.d.). Unidad Cartográfica: 26. Corrientes, Corrientes.
- INTA, E. E. A. C. (n.d.). UNIDAD CARTOGRAFICA: 7. Corrientes, Corrientes.
- INTA, E. E. A. C. (n.d.). UNIDAD CARTOGRAFICA: 101. Corrientes, Corrientes.
- INTA, E. E. A. C. (n.d.). UNIDAD CARTOGRAFICA: 1. Corrientes, Corrientes.
- INTA, E. E. A. C. (n.d.). UNIDAD CARTOGRAFICA: 59. Corrientes, Corrientes.
- INTA, E. E. A. C. (n.d.). UNIDAD CARTOGRAFICA: 38. Corrientes, Corrientes.
- <http://sisinta.inta.gob.ar/es/perfiles/1202>
- <http://sisinta.inta.gob.ar/es/perfiles/1677>

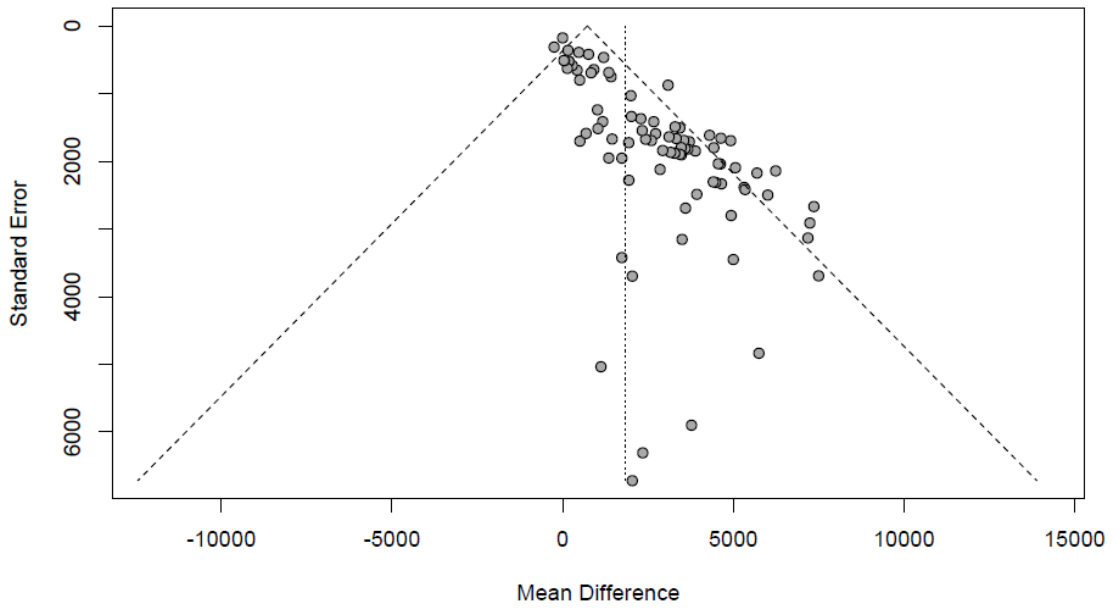
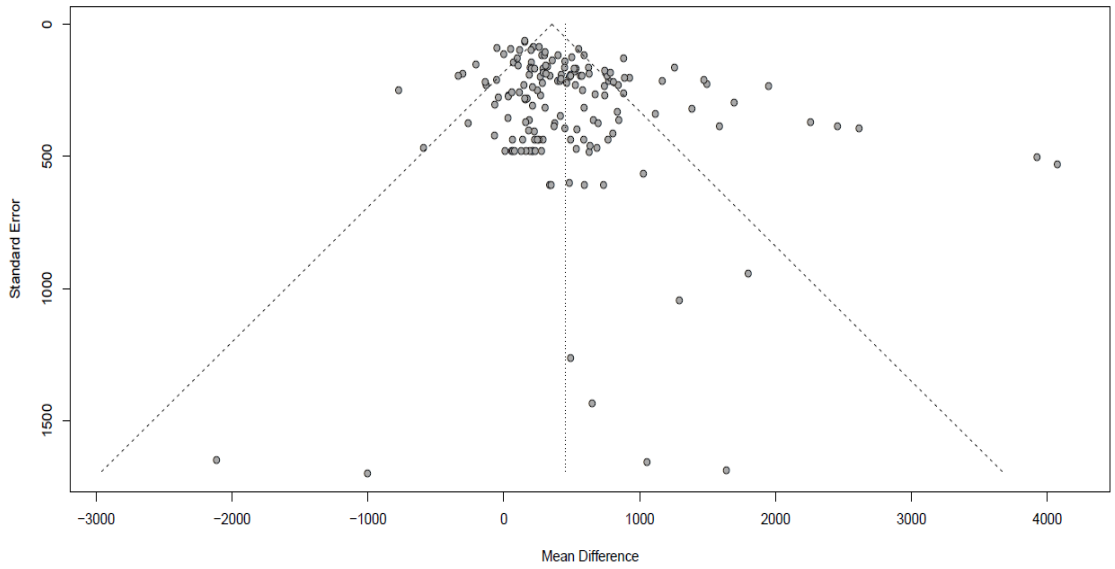
Table S4: List of species P mobilizing

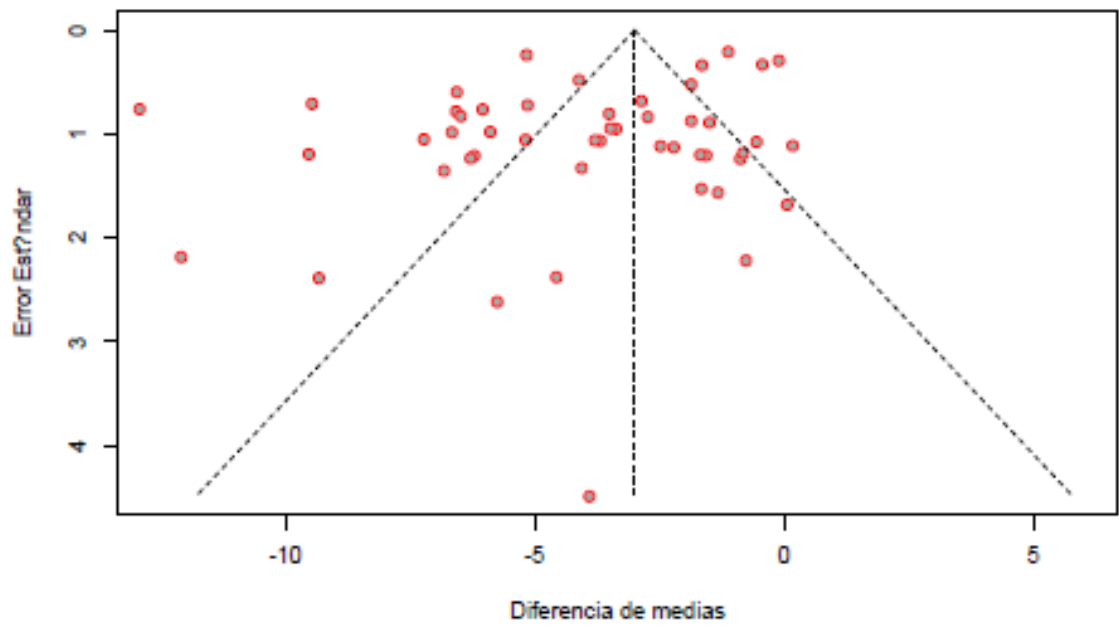
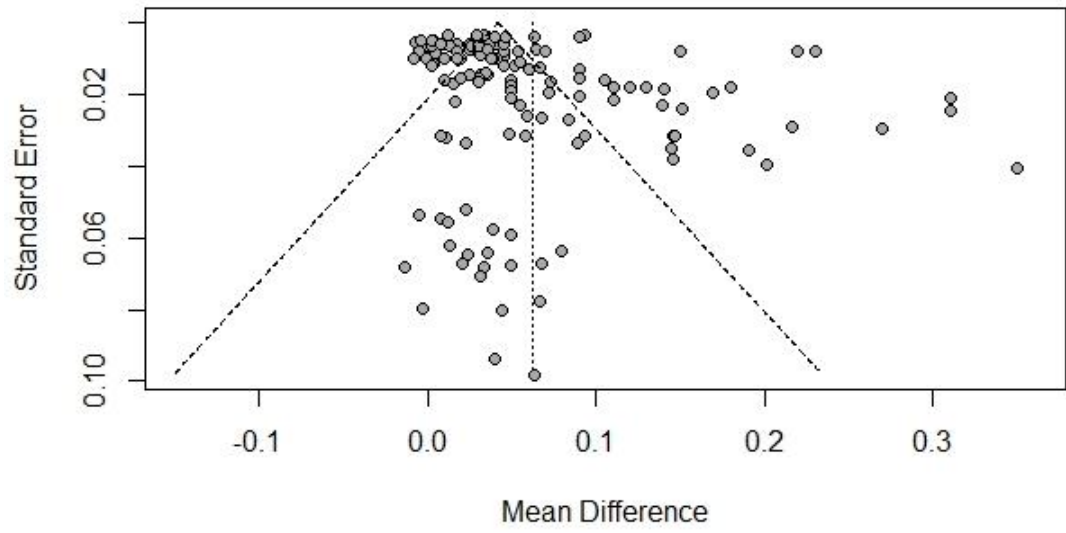
Phosphorus Mobilizing (SP)	Non Phosphorus Mobilizing (NonSP)
----------------------------	-----------------------------------

<i>Cyperacea sp.</i>	<i>Adesmia bicolor</i>	<i>Lolium multiflorus</i>
<i>Oxalis sp.</i>	<i>Adesmia punctate</i>	<i>Lotus tenuis</i>
<i>Trifolium polymorphum</i>	<i>Agenium villosum</i>	<i>Medicago lupulina</i>
<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	<i>Medicago minima</i>
<i>Panicum sp.</i>	<i>Andropogon lateralis</i>	<i>Medicago polymorpha</i>
<i>Panicum gouinii</i>	<i>Andropogon ternatus</i>	<i>Melica brasiliانا</i>
<i>Briza sp.</i>	<i>Aristida jubata</i>	<i>Mentha pulegium</i>
<i>Briza minor</i>	<i>Aristida murina</i>	<i>Nasella af. rosengurtti</i>
<i>Briza subaristata</i>	<i>Aristida sp.</i>	<i>Nassella megapotamia</i>
	<i>Aristida spagazzinii</i>	<i>Nassella neesiana</i>
	<i>Aristida uruguayensis</i>	<i>Nassella hyalina</i>
	<i>Aristida venustula</i>	<i>Paspalidium paludivagum</i>
	<i>Axonopus affinis</i>	<i>Paspalum alnum</i>
	<i>Axonopus argentes</i>	<i>Paspalum dilatatum</i>
	<i>Axonopus compressus</i>	<i>Paspalum distichum</i>
	<i>Axonopus siccus</i>	<i>Paspalum nicorae</i>
	<i>Baccharis coridifolia</i>	<i>Paspalum notatum</i>
	<i>Baccharis sp.</i>	<i>Paspalum plicatulum</i>
	<i>Baccharis spicata</i>	<i>Paspalum pumilus</i>
	<i>Bothriochloa imperatoide</i>	<i>Paspalum quadrifarium</i>
	<i>Bothriochloa laguroides</i>	<i>Phalaris aquatica</i>
	<i>Bothriochloa saccharoides</i>	<i>Phalaris platensis</i>
	<i>Bromus auleticus</i>	<i>Phyla canescens</i>
	<i>Carduus acanthoides</i>	<i>Piptochaetium aspero</i>
	<i>Centaureum pulchellum</i>	<i>Piptochaetium bicolor</i>
	<i>Cerastium glomeratum</i>	<i>Piptochaetium montevidense</i>
	<i>Chloris canterae</i>	<i>Piptochaetium stipoides</i>
	<i>Chloris ciliate</i>	<i>Piptochaetium panicoides</i>
	<i>Coelorhachis selloana</i>	<i>Plantago lanceolata</i>
	<i>Danthonia montevidensis</i>	<i>Plantago myosuroides</i>
	<i>Desmanthus virgatus</i>	<i>Poa lanigera</i>
	<i>Desmodium incanum</i>	<i>Puccinellia glaucescens</i>
	<i>Desmodium triflorum</i>	<i>Richardia sp.</i>
	<i>Dichondra sericea</i>	<i>Schizachyrium salzmannii</i>
	<i>Distichlis scopiara</i>	<i>Schizachyrium spicatum</i>
	<i>Distichlis spicata</i>	<i>Schizachyrium tenerum</i>
	<i>Eragrostis airoides</i>	<i>Setaria parviflora</i>
	<i>Eragrostis bahiensis</i>	<i>Setaria vaginata</i>
	<i>Eragrostis lugens</i>	<i>Sorghastrum setosum</i>
	<i>Eragrostis neesii</i>	<i>Spilanthes sp.</i>
	<i>Eragrostis virescens</i>	<i>Sporobolus indicus</i>
	<i>Eryngium echinatum</i>	<i>Sporobolus pyramidatus</i>

<i>Eryngium paniculatum</i>	<i>Steinchisma hians</i>
<i>Eustachys bahiensis</i>	<i>Stenachaenium campestre</i>
<i>Gaudinia fragilis</i>	<i>Stenotaphrum secundatum</i>
<i>Hypochaeris sp.</i>	<i>Stipa papposa</i>
<i>Ischaemum minus</i>	<i>Stylosanthes montevidensis</i>
<i>Juncus sp.</i>	<i>Trachypogon spicatus</i>
<i>Leersia hexandra</i>	<i>Tridens hackelii</i>
<i>Leontodon taraxacoides</i>	<i>Vulpia australis</i>
<i>Leptocoryphium lanatum</i>	

Figure S1, Funnel plots for each variable (ANPP-DM, ANPP-FM, P concentration and N:P ratio)





3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN CAMPOS NATURALES **MEJORADOS – PRINCIPALES IMPULSORES Y CONSECUENCIAS**

3.1. RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) por las leguminosas forrajeras es central para incrementar la productividad y sustentabilidad de sistemas pastoriles. La FBN es afectada por múltiples factores, principalmente por la fertilidad de suelo, el estado nutricional de la leguminosa y el clima. Los pastizales del “Río de la Plata” (PRP) representan un extenso ecosistema dominado por pasturas naturales con una productividad limitada por el clima y la fertilidad de suelos. La incorporación de leguminosas de alto potencial, más la fertilización fosfatada (P), sin eliminar el tapiz natural, en los “Mejoramientos de Campo Natural” (MECN) ha sido una tecnología efectiva para incrementar la productividad de estos sistemas. No existe estimaciones de FBN ni a nivel experimental ni regional en los MECN, tampoco qué factores la condicionan o su efecto en el resto de la comunidad. En 69 sitios comerciales a lo largo de Uruguay se estimó la FBN y las principales variables de suelo y planta. En promedio $67 \pm 26\%$ del N de las leguminosas proviene de FBN, con una eficiencia de fijación de $19,4 \pm 8,2$ (kg N fijado Mg MS⁻¹), con gran variabilidad para los dos parámetros. Trébol blanco presenta un nivel superior de FBN respecto a los Lotus. Las características de suelo explican muy poco el proceso de FBN, desatacando el nivel de fertilización P acumulada (kg P ha⁻¹). La relación N:P para gramíneas-C₄ y gramínoideas-C₃ muestra una deficiencia relativa de N o un exceso en concentración de P a pesar del N incorporado por FBN de leguminosas.

Palabras claves: Bioma Pampa, leguminosa, fertilización fosfatada, ¹⁵N abundancia natural, N:P planta.

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION ON IMPROVED NATURAL GRASSLAND - MAIN DRIVERS AND CONSEQUENCES

3.2. ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) by forage legumes is central to increasing productivity and sustainability of pastoral systems. BNF is affected by multiple factors, mainly by soil fertility, legume nutritional status and climate. "Río de la Plata" grasslands represent an extensive ecosystem dominated by natural grasslands with limited productivity due to climate and soil fertility. The incorporation of high potential legumes, plus phosphate fertilization (P) without removing the natural species, in the "Improved Natural Grassland" (ING) has been an effective technology to increase the productivity of these systems. So far there are no estimates of BNF neither at the experimental or regional level in the ING, nor what factors condition it or BNF effect on the rest of grassland community. In 69 commercial sites throughout Uruguay, BNF and main soil and plant variables were estimated. On average $67 \pm 26\%$ of N of legumes comes from BNF, with a fixation efficiency of 19.4 ± 8.2 (kg N fixed Mg DM⁻¹) with great variability in both cases. White clover presented a higher level in %BNF than Lotus. Soil properties explain very little BNF process, highlighting accumulated P fertilization level (kg P ha⁻¹). The N: P ratio for grasses-C₄ and graminoids-C₃ shows a relative deficiency of N or a P concentration excess in despite of the N incorporated by BNF for legumes.

Keywords: Pampa Biome, legume, phosphorus fertilization, ¹⁵N natural abundance, N:P plant.

3.3. INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) a nivel terrestres por la vegetación natural y la agricultura representan menos del 30% del Nitrógeno (N) total anual fijado tanto por vías naturales como industriales en la superficie terrestre y océanos, que alcanza un total de 413 Tg⁽¹⁾. El proceso de FBN derivado de la asociación entre bacterias (*Rhizobium*) y plantas (*Fabaceae*) es central para la sustentabilidad de sistemas agrícolas y pastoriles. Por ejemplo, permite la reducción en el uso de fertilizantes nitrogenados de origen industrial, a través de su uso como cultivo cobertura, abono verde, en rotaciones de cultivos, policultivos, entre otros⁽²⁾. Las leguminosas en sistemas pastoriles mejoran el valor nutritivo y el consumo total de forraje por los animales, al tiempo que los compuestos secundarios presentes en las leguminosas permiten mejorar la utilización del N y reducir los gases de efecto invernadero producto de la fermentación entérica⁽³⁾. La FBN en pasturas mezclas de leguminosas y gramíneas es afectada principalmente por la productividad y persistencia de la leguminosa, la competencia con la gramínea y el nivel de N en el suelo⁽⁴⁾, siendo escaso los trabajos que consideran el P del suelo.

La FBN es un proceso enzimático (nitrogenasa) desarrollado por bacterias en los nódulos de la leguminosa, que implica la reducción de moléculas de N₂ a NH₄⁺ con un alto costo energético. Por tanto, todo lo que limite la formación, crecimiento y funcionamiento de los nódulos afectará la FBN. Los principales factores de stress abiótico de la FBN y del crecimiento de la leguminosa son la temperatura y la disponibilidad de agua⁽⁵⁾, actuando de forma individual o combinada afectando diferentes procesos metabólicos⁽⁶⁾. La acidez del suelo y la presencia de aluminio intercambiable limita la FBN, aunque afecta en mayor medida a bacterias que a plantas, encontrando enormes variaciones entre genotipos de ambos organismos^(2,7). Autores señalan que el pH no afecta el % FBN, si los kg N fijado al afectar el crecimiento de la leguminosa⁽⁸⁾. La disponibilidad de nutrientes como P, potasio (K) o azufre (S) condicionan la FBN de forma directa, modificando la actividad y el desarrollo de los nódulos, y de forma indirecta, afectando el crecimiento de la planta

y la demanda de N. Para los tres nutrientes mencionados se señala al mecanismo de retroalimentación de N, que implica una acumulación de N en planta y mayores valores de N:P, N:K y N:S, como responsable de los efectos en la actividad de los nódulos⁽⁹⁾. El mecanismo de retroalimentación de N, que implica una regulación “hacia abajo” (*down regulation*) se da tanto en ambientes deficitarios de nutrientes⁽¹⁰⁾, como en ambientes ricos en N producto de la fertilización nitrogenada⁽¹¹⁾. Alta disponibilidad de N reduce la FBN y la presencia de leguminosas a escala de potreo^(12,13), afectando también los ciclos de competencia entre leguminosas y gramíneas en pasturas mezclas^(4,14).

Los pastizales del “Río de la Plata” (PRP) representan un Bioma al sur de América del Sur formado por las regiones de Pampas y Campos⁽¹⁵⁾. Actualmente, menos de 280.000 km² (de los 700.000 km² originales) de este bioma siguen siendo pastizales naturales en Argentina^(16,17), Brasil^(18,19) y Uruguay⁽²⁰⁾. Estos pastizales templados y subtropicales, subhúmedos, caracterizados por una gran diversidad de plantas⁽²¹⁾ y animales⁽²²⁾, se utilizan principalmente para la producción ganadera extensiva, pero también brindan otros servicios ecosistémicos, incluidos el suministro de agua, el control de la erosión y la regulación del ciclo de nutrientes⁽²³⁾. Las principales limitantes de la productividad de estos pastizales son la disponibilidad de agua, mediada por la capacidad de almacenamiento de agua de los suelos⁽²⁴⁾, la temperatura y radiación en el invierno⁽²⁵⁾, y la fertilidad del suelo, principalmente N y no fósforo (P) (Cardozo, et al., in pres-Cap.2). Esto determina que la productividad sea baja en invierno y muy variable en función de las precipitaciones en los meses más cálidos. Predominan en la comunidad especies estivales, principalmente gramíneas C₄, y en menor medida gramíneas invernales (C₃). La frecuencia de leguminosas nativas es baja, limitando muchas veces la calidad del forraje⁽²⁶⁾.

Los “Mejoramientos de Campo Natural” (MECN) que implican la siembra de leguminosas invernales, exóticas de alto potencial de crecimiento junto con la fertilización fosfatada, sin la eliminación del tapiz natural, es una tecnología que ha

sido evaluada en Uruguay desde 1958⁽²⁷⁾. Las leguminosas utilizadas en estas pasturas han sido trébol blanco (*Trifolium repens*. L)⁽²⁸⁾ y en mayor medida especies del género *Lotus* por su mejora adaptación a las condiciones ambientales locales^(29,30), destacándose *Lotus subbiflorus* Lag. cv “El Rincón” con la mayor área (> 200.000 ha y 2000 productores)⁽²⁰⁾. Los MECN buscan simultáneamente aumentar la producción total, invernal y mejorar la calidad nutricional, basado en la productividad de la leguminosa y la FBN, como mecanismo de ingreso de N al sistema. Los antecedentes nacionales de medición de FBN son escasos y concentrados en pasturas cultivadas^(31,32), siendo inexistentes registros para leguminosas en MECN.

El estado nutricional de las leguminosas sembradas en MECN, así como de toda la comunidad presente, puede ser evaluado a través de indicadores que reflejan la disponibilidad y el uso de uno o más nutrientes. El contenido de N o P en planta no representa *per se* un indicador de estado nutricional, al no considerar el concepto de dilución de nutrientes con el incremento de la biomasa⁽³³⁾. El Índice de Nutrición Nitrogenada (INN) es un indicador del estado nutricional de cultivos y pasturas, C₃ y C₄, gramíneas y leguminosas, que da cuenta de la relación alométrica nitrógeno-biomasa⁽³⁴⁾. INN de la leguminosa puede ser usado junto a otros indicadores de disponibilidad de N del suelo para simular el % FBN en función de los conceptos de regulación interna de N⁽³⁵⁾. Sin embargo, una limitante en el uso de INN es las curvas de dilución de nitrógeno⁽³³⁾.

La transferencia de N desde la leguminosa a los componentes no leguminosos ha sido cuantificada por diferentes métodos, pero a pesar de los avances en el uso de la técnica de abundancia natural de ¹⁵N, la misma no permite hacer cuantificaciones lo suficientemente precisas⁽³⁶⁾. Por último, el uso de las relaciones estequiométricas entre diferentes elementos, principalmente N y P, ha sido propuesto para estimar limitantes o deficiencias relativas entre elementos en ambientes naturales^(37,38), y cultivos⁽³⁹⁾. Más recientemente se han hecho esfuerzos por sintetizar y avanzar sobre el estado nutricional de las plantas en base a los conceptos antes mencionados, la

curva de dilución en función de la biomasa y las relaciones entre diferentes nutrientes para extender los avances conceptuales sobre N a otros elementos como P y K⁽⁴⁰⁾.

El objetivo del presente artículo es i) cuantificar la FBN en MECN en sistemas reales bajo condiciones diversas, ii) identificar los principales factores que afectan la FBN y iii) evaluar las consecuencias de la FBN inmediata y acumulada en el estado nutricional de la leguminosa y gramíneas de los MECN. Nuestras hipótesis son que existe una alta variabilidad en FBN en Mejoramientos de Campo Naturales comerciales a escala regional en Uruguay dada la variabilidad de ambientes (suelos y clima) y niveles de fertilización. La FBN (medida como proporción del N-FBN en la leguminosa y los kg N-FBN por tonelada de materia seca de leguminosa) está afectada por el estado nutricional de la leguminosa y el nivel de fertilidad del suelo. La FBN afecta el estado nutricional de la comunidad, principalmente de las gramíneas independiente del metabolismo (C₃ o C₄).

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Sitios y mediciones

Se midieron 69 situaciones de MECN, entre noviembre y diciembre del 2017, abarcando una vasta región de Uruguay, incluyendo principalmente áreas ganaderas. Fueron incluidos MECN de variadas edades con siembras desde 1 a más de 30 años, sembrados con *Lotus subiflorus*, *L. pedunculatus*, *Trifolium repens*, *L. angustissimus*, *L. corniculatus*, *L. tenuis*, incluyendo 29 tipos de suelos.

En cada sitio se tomaron 2 muestras apareadas con presencia y ausencia de la leguminosa sembrada, a una distancia menor a 5 m, buscando reducir las variaciones de suelo. Ambas muestras dentro del mismo potrero estuvieron sujetas al mismo manejo general tanto de fertilización, pastoreo, rotativa, cierres, etc.

A nivel de planta se realizaron medidas no destructivas: altura, NDVI manual (GreenSeeker®); así como medidas destructiva derivadas del corte de biomasa como, forraje disponible total y por componentes del MECN: Leguminosa, Gramínea estival-C₄, Graminoides- C₃, Gramínea invernales- C₃, y restos secos. A partir del material vegetal recolectado por componente se determinó el contenido de P (ICP-OES PerkinElmer Optima 7300 DV, Laboratorio análisis suelo, INIA La Estanzuela) y el contenido de N, C, y la abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ (Isotope Ratio Mass Spectrometer. Delta plus, Thermo Finnigan acoplado via Conflo III ambos con analizador de elemento Carlo Erba, Technical University of Munich). Adicionalmente se determinó las principales 10 especies integrantes de la comunidad.

A nivel de suelo se tomaron muestras en cada uno de los cuadros del par en cada sitio a 2 profundidades 0-5 y 0-15 cm, las cuales fueron usadas para análisis de pH-H₂O, en ambas profundidades y P-Ac. Cítrico, K-intercambiable, Potencial de mineralización de N-PMN, sólo para 0-15 cm.

Se relevó variables de manejo a partir de la información brindada por cada productor (edad, fertilización, sp sembrada, tipo de suelo) así como también de la derivada de los análisis de planta y suelo. Se calcularon variables como índices ej P:K del suelo o relaciones N:P para los componentes vegetales. Las variables climáticas asociadas derivan de los productos de NASA/POWER (NASA Prediction Of Worldwide Energy Resources; <https://power.larc.nasa.gov/>) para precipitación, temperatura suelo y radiación.

La proporción de N derivado de FBN (%FBN) en la leguminosa, se calculó en base a las recomendaciones de Unkovich, et al., (2008), tomando como referencia el promedio de todas las plantas no fijadoras en el marco acompañado o no por la planta fijadora y usando el valor “B” de -1, considerando las especies de leguminosas presente⁽⁴¹⁾. La Eficiencia de FBN (Ef-FBN) en kg N FBN Mg MS-Leguminosa⁻¹, se calculó considerando el contenido total de N y el peso seco del componente leguminoso. Adicionalmente se calculó el estado nutricional de N en base al Índice de Nutrición Nitrogenada (INN), tomando como base las curvas de dilución generales para pasturas templadas (C₃) y tropicales (C₄)⁽³⁴⁾, de P basado en el Índice de Nutrición Fosfatado (INP)⁽⁴⁰⁾ y de la relación N:P para todos los componentes de la pasturas.

3.4.2 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se usaron 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 fue evaluado inicialmente utilizando regresión lineal simple. Conjuntamente se comparó el valor de cada variable auxiliar para el percentil 15 vs 85 de las variables respuesta (%FBN y Ef-FBN) a través de una prueba-*t*. Para algunas variables de especial interés se exploraron adicionalmente Funciones de Frontera⁽⁴²⁾ para ver el grado de limitación dado por el factor evaluados. Regresiones múltiples con las principales variables auxiliares fueron testadas para %FBN y Ef-FBN. La correlación entre

variables auxiliares y su distribución para suelo, estado de la leguminosa y clima se presentan en apéndice (A1, A2 y A3) Los análisis estadísticos fueron realizados con el software INFOSTAT⁽⁴³⁾ y R-Studio (Versión 1.1.456).

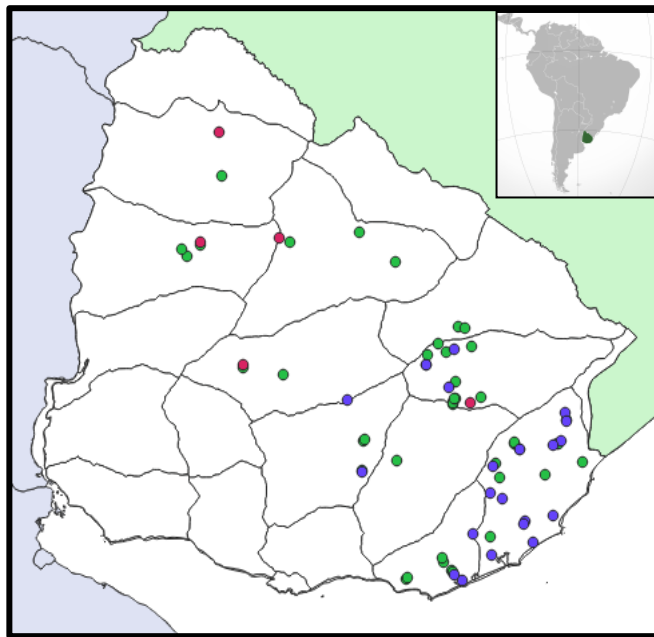


Figura 1. Distribución de los MECN evaluados para determinar FBN en Uruguay. Los puntos verdes, azules y rojos representan sitios con Lotus anual, Lotus perenne y Trébol blanco respectivamente.

3.5. RESULTADOS

3.5.1 Caracterización de los sitios

La distribución geográfica de los MECN según tipo de leguminosa sembrada (Lotus anual, Lotus perenne o Trébol blanco) se muestra en la Fig. 1, donde es posible ver una mayor concentración de sitios hacia el Este de Uruguay. Las principales características de las comunidades vegetales evaluada, tanto en los parches con presencia o ausencia de leguminosa, se muestra en la Fig. 2a, donde el aporte promedio de la leguminosa en los casos presente es de 9% y los componentes principales son los restos secos (ReSeco) y Gramíneas Estivales (Gr.Est(C₄)) con un aporte medio de 45-48% y 30-35% respectivamente con presencia-ausencia de leguminosa respectivamente. Las especies más frecuentes en los MECN donde se tomaron muestras se detalla en la Fig.2b, siendo *Axonopus fissifolius* (Raddi) Kuhlm, *Cynodon dactylon* (L.) Pers. y *Lolium multiflorum* Lam., las especies más frecuentes.

Dada la gran dispersión espacial de los MECN muestreados, 29 tipos de suelo (CONEAT) fueron incluidos, las características edáficas de los sitios se resumen en la Cuadro 1., donde se destaca la gran variabilidad para casi todas las variables registradas. Los niveles de fertilización fosfatada aplicados en los MECN fueron muy variados entre situaciones, con un rango de 46 a 1672 kg P ha⁻¹ acumulado, con estrategias de fertilización y dosis anuales extremadamente variables (20-175 kg P ha⁻¹). El estado nutricional de los 3 componente vegetales analizados se muestra en Cuadro A4, observando la mayor diferencia en el contenido de N (%N) así como las relacione N:P y C:N, entre Leguminosa y las no leguminosas.

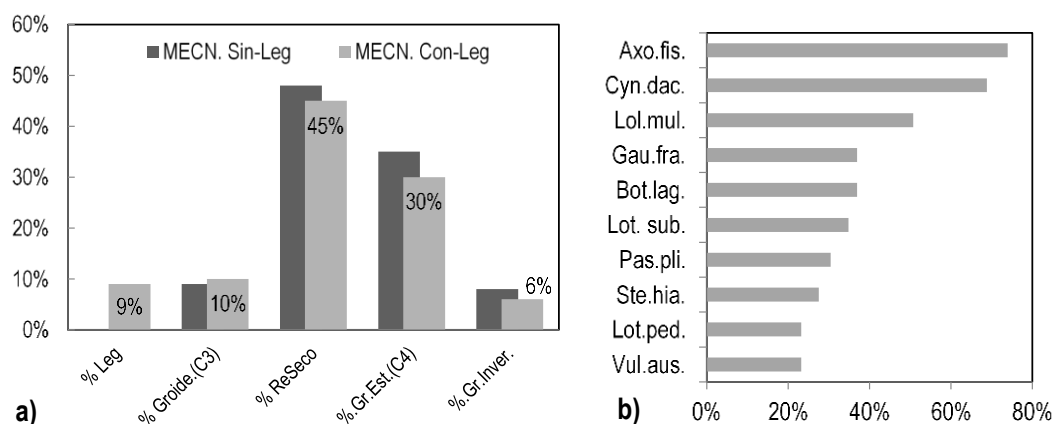


Figura 2. Características medias de las comunidades MECN, a) proporción de los principales componentes según presencia (Con-Leg) o ausencia (Sin-Leg) de leguminosa, Leg: Leguminosa, Groide.(C₃): Graminoides (C₃), ReSeco: Resto Seco, Gr.Est.(C₄): Gramínea Estivales (C₄), Gra.Inve.: Gramínea Invernales ; b) frecuencia de aparición de las principales especies relevadas en los sitios de muestreo, Axo.fis. (*Axonopus fissifolius*), Cyn.dac. (*Cynodon dactylon*), Lol.mul. (*Lolium multiflorus*), Gau.fra. (*Gaudinia fragilis*), Bot.lag. (*Bothriochloa laguroides*), Lot.sub. (*Lotus subbiflorus*), Pas.pli. (*Paspalum plicatulum*), Ste.hia. (*Steinchisma hians*), Lot.ped. (*Lotus pedunculatus*), Vul.aus. (*Vulpia australis*).

Cuadro 1. Propiedades del suelo asociadas a muestras de suelo recolectadas en todo el territorio uruguayo.

Variables	n	Media	DS	Min	Max
pH (H ₂ O)-5	138	5,6	0,6	4,8	8,0
pH (H ₂ O)-15	138	5,8	0,7	5,0	8,7
Fósforo (P)	138	8,9	7,8	1,3	41,1
Potasio (K)	138	0,3	0,2	0,1	0,9
P:K	138	30,6	26,5	4,4	165,9
PMN ⁺	75	123,6	62,2	31,0	389,0
N:P [∞]	75	21,2	14,1	2,7	72,9
MOS [*]	69	5,7	2,3	2,3	11,4
Arcilla % [*]	69	24,8	10,3	3,4	56,5
CAW [*]	69	106,3	46,1	18,0	190,0

+ Potencial de Mineralización de Nitrógeno

∞Cálculo a partir de PNM y P; * Descripción según Taxonomía de Suelos (MGAP)

3.5.2 Nivel de fijación biológica de nitrógeno

Los niveles de N derivado de la Fijación Biológica (%FBN) para los MECN evaluadas muestran una amplia variabilidad con un valor promedio de $67 \pm 26\%$, con más de un cuarto de los casos con valores inferiores a 50% (Figura 3a). La eficiencia de fijación de N (Ef-FBN) muestra un comportamiento similar, aunque algo más variable que el %FBN (40 vs 37 CV respectivamente) con una media de $19,4 \pm 8,2$ (kg N fijado Mg MS⁻¹) y más de un tercio de los MECN con una Ef-FBN menor a 15 (kg N fijado Mg MS⁻¹) (Figura 3b). La relación entre %FBN y Ef-FBN está determinada por que la primera integra la base de cálculo de la segunda, con una alta, positiva y significativa correlación de 0,88 ($p < 0,001$). Para las otras dos variables involucradas, %N y el peso seco de la leguminosa, las correlaciones son 0,36 ($p < 0,01$) y 0,24 ($p < 0,05$) respectivamente. La especie de leguminosa presente en el MECN afecta %FBN, pero no Ef-FBN, siendo superior la proporción de N derivado de fijación en el caso de Trébol blanco respecto de los Lotus anuales o perennes (Cuadro 2).

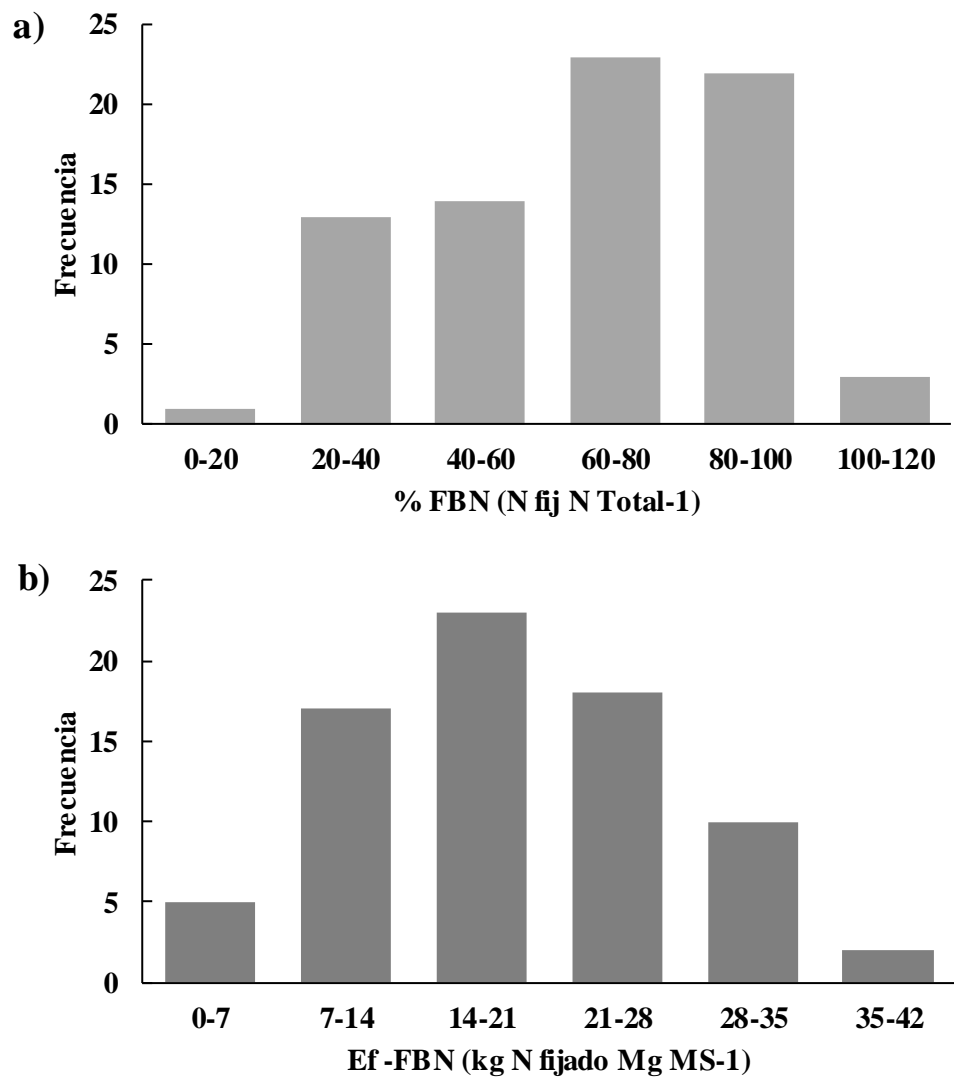


Figura 3. Histograma de frecuencia absoluta para a) %FBN y b) Ef-FBN

Cuadro 2. %FBN y Ef-FBN en función del tipo de leguminosa presente en el MECN.

	n	%FBN		Ef-FBN
Lotus perenne	27	56,2	b*	17,4
Lotus anual	43	70,1	b	19,3
Trébol blanco	5	91,2	a	28,6

*Letras iguales no difieren, $P < 0.05$, *t*-test.

3.5.3. Factores que afectan la FBN

No se identifican factores mayores que expliquen la alta variabilidad observada en %FBN ni Ef-FBN. Cuando se compara el valor medio y el rango de variación para variables respuesta entre los niveles superior e inferior (13%, para n~9) es posible identificar algunas variables explicativas. Por ejemplo, para %FBN, el K del suelo, el % P en planta para leguminosa, así como para el peso seco de leguminosa (PS_Leg) y la relación leguminosa con el resto de los componentes verdes de la comunidad (Leg/Tot.v), muestran valores superiores en los niveles más altos de %FBN (Cuadro 4). Simultáneamente el análisis de regresiones simples por variable permite identificar aquellas que tienen mayor influencia, destacando el nivel de fertilización acumulada (Fert.Acum.(kg)), la relación N:P de la leguminosa, los días julianos, la Latitud, las precipitaciones acumuladas (PP.ac._) a los 30 y 90 días, y la radiación acumulada a los 90 días (Cuadro 3). La regresión múltiple con las principales variables identificadas utilizando el método “stepwise”, alcanza un R^2 de 0,32 ($p < 0,001$), donde se destaca la precipitación, la temperatura y fertilización P como factores positivos y %N en la leguminosa como negativo.

Cuadro 3. Relación entre las variables de suelo, de la Leguminosa y del clima, con el %FBN para MECN evaluados en Uruguay. Variables sombreadas en gris explicaron la máxima variación en %FBN según el análisis de regresión “stepwise” ($R^2 = 0,32$)

	%FBN		Regresión Linear %FBN		
	Superiores ⁺	Inferiores	P-value	R ²	Pendiente
%FBN	102,9	23,0*			
<i>Propiedades de suelo</i>					
pH (0-5)	5,93	5,73	0,288	0,02	0,05
pH(0-15)	5,96	5,97	-	-	-
P (AcCit).ppm	13,63	6,83	0,335	0,01	-
K	0,33	0,24*	0,143	0,03	0,28
P:K_soil	50,89	32,38	0,393	0,01	-
PMN	127,9	103,0	0,612	-	-
Fert. Acum.(kg)	467,1	266,7	0,010	0,10	-
<i>Estatus de Leguminosa</i>					
PSLeg (tt/ha)	0,32	0,13*	0,440	0,01	0,1
Rel Leg/Tot(v)	0,10	0,05*	0,803	-	-
NDVI.GS	0,53	0,60	0,444	0,01	-
%N-Leg	2,79	2,87	0,666	-	-
%P-Leg	0,20	0,15*	0,152	0,03	0,79
N/P-Leg	14,06	22,03	0,044	0,06	-0,01
<i>Clima</i>					
d_Juliano	337	348	0,025	0,06	-
Latitud	- 33	- 34	0,002	0,12	0,1
PP.ac_30	63	27	0,029	0,06	-
PP.ac_90	363	229	0,001	0,14	-
Rad.Sol_30	225	228	0,411	0,01	-
Rad.Sol_90	512	565	0,038	0,06	-
Temp.s_30	602,3	599,5	0,616	-	-
Temp.s_90	1581,6	1583,1	0,644	-	-

⁺Superiores e Inferiores representan los valores asociados a %FBN del 13% superiores e inferior de los datos (cuartil 1 vs 9), con un n ~9.

*p<0,05 (T-test)

Para Ef-FBN, la comparación entre niveles superiores e inferiores destaca en primer término la falta de diferencias para la propia variable Ef-FBN, de igual modo aparecen diferencia en las variables vinculadas al contenido de P en planta (%P-Leg) (Cuadro 4). Las principales variables identificadas por medio de regresión múltiple utilizando el método “stepwise”, son la precipitación y la fertilización nuevamente, junto con el N del suelo por medio de PMN, logrando un R^2 de 0,41 ($p < 0,001$).

Para algunas variables es posible identificar “Funciones Frontera” (FF) donde %FBN estaría condicionando por ese factor, casi siempre en un rango de 0,7 a 1,0. Dada la hipótesis original que vincula la fertilidad del suelo con los niveles de FBN y la amplia literatura sobre el rol del P en la FBN, se calculó la FF para el nivel de P disponible en el suelo, determinado por el método Ácido Cítrico, y el nivel de fertilización acumulada en cada MECN. Encontrando que el %FBN está limitado por el nivel de P disponible en suelo a valores menores a 10 ppm y de 400 kg ha⁻¹ de fertilización acumulada (Figura 4). Los niveles de P disponible en el suelo y de fertilización acumulada se correlacionan positivamente con el estatus de P en planta para los componentes C₃ (0,47 y 0,38) y C₄ (0,38 y 0,52) respectivamente, todos significativos ($p < 0,01$), pero no para el componente leguminoso. Para otras variables de suelo como K, K:P, pH o PMN no parece tan clara la interpretación de la FF, dado que en general tienen poco impacto en explicar la variabilidad tanto en %FBN como en Ef-FBN.

Cuadro 4. Relación entre las variables de suelo, de la Leguminosa y del clima, con la Ef-FBN (kg N fijado Mg MS⁻¹) para MECN evaluados en Uruguay. Variables sombreadas en gris explicaron la máxima variación en Ef-FBN según el análisis de regresión “stepwise” (R² = 0,41)

	Ef- FBN		Regresión Linear Ef- FBN		
	Superiores ⁺	Inferiores	P-value	R ²	Pendiente
Ef-FBN	32.95	6.68			
<i>Propiedades de suelo</i>					
pH (0-5)	5,9	5,7	0,509	0,01	1,03
pH(0-15)	6,1	6,0	0,779	-	-
P (AcCit)ppm	9,5	6,8	0,668	-	-
K	0,34	0,24	0,376	0,01	5,2
P:K_soil	42,2	32,4	0,397	0,01	0,03
PMN	149,2	98,7	0,339	0,01	0,01
Fert. Acum.(kg)	542,6	267,8	0,004	0,13	0,10
<i>Estatus de Leguminosa</i>					
PSLeg (Mg ha ⁻¹) [∞]	0,34	0,14	0,037	0,06	8,37
Rel Leg/Tot(v)	0,06	0,06	0,152	0,03	19,82
NDVI.GS	0,53	0,67*	0,003	0,13	25,39
%N-Leg [∞]	3,64	2,79	<0,0001	0,13	5,24
%P-Leg	0,25	0,15*	0,002	0,14	50,82
N/P-Leg	14,6	19,3	0,062	0,05	-0,28
%FBN [∞]	92,3	27,0*	<0,0001	0,78	27,72
<i>Clima</i>					
Días Juliano	337	351	0,000	0,18	-0,26
Latitud	- 33	- 34	0,009	0,09	2,62
PP.ac_30	75,38	26,37	0,000	0,16	0,08
PP.ac_90	367,24	230,26	< 0,0001	0,24	0,04
Rad.Sol_30	221,77	228,76	0,286	0,02	-0,02
Rad.Sol_90	501,94	561,44	0,194	0,02	-0,01
Temp.s_30	596,1	590,9	0,286	0,02	-0,02
Temp.s_90	1557,7	1573,0	0,194	0,02	-0,01

⁺Superiores e Inferiores representan los valores asociados a %FBN del 13% superiores e inferior de los datos (cuartil 1 vs 9), con un n ~9.

*p<0,05 (*T-test*), [∞]Variables que integran el cálculo de Ef-FBN, no son consideradas en análisis de regresión “stepwise”.

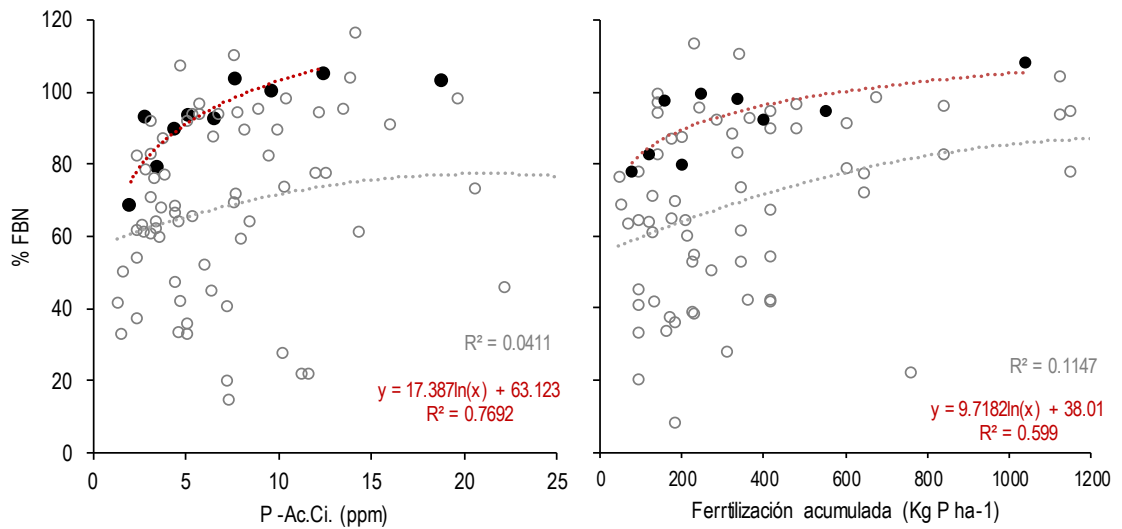


Figura 4. Relación entre el %FBN y el P disponible en el suelo por método de Ácido Cítrico (ppm) y por el P acumulado por fertilización (kg P ha^{-1}). Puntos negros y línea roja representan Función de Frontera para ambas variables

3.5.4. Estado nutricional de la pastura

El N fijado biológicamente que entra en el sistema se espera tenga efectos en el resto de los componentes de la pastura en el corto, pero sobre todo en el mediano y largo plazo. El estado nutricional de la leguminosa no se vincula al %FBN actual. El grado de correlación entre INN de la Leguminosa y el INN del resto de los componentes C_3 y C_4 es moderado, 0,31 y 0,38 respectivamente y significativo ($p < 0,01$) en ambos casos. Esta asociación se observa también al comparar los INN de C_3 y C_4 , y el %N- C_3 y C_4 para los niveles superiores e inferiores de INN-Leg, con diferencias claras y con valores mayores en los MECN donde la leguminosa presentaba mejor INN (Cuadro 5). El contenido de P de la leguminosa y gramínea- C_4 , y el INP de la leguminosa es mayor en los niveles superior de INN (Cuadro 5). El estatus nutricional de los diferentes componentes de la pastura analizado a través de la relación N:P muestra que para el caso de las leguminosas hay un 36 y 29% de los casos por debajo de una relación N:P 15 y por encima de 20 respectivamente,

mostrando una variedad de situaciones de relativa limitación de N, P y de co-limitación. Para los componentes C₃ y C₄ el 95 y 93% de los casos están por debajo de 15, y 60 y 66% por debajo de N:P de 10, para los dos componentes respectivamente, lo que indica una limitante relativa mayor por N (Figura 5).

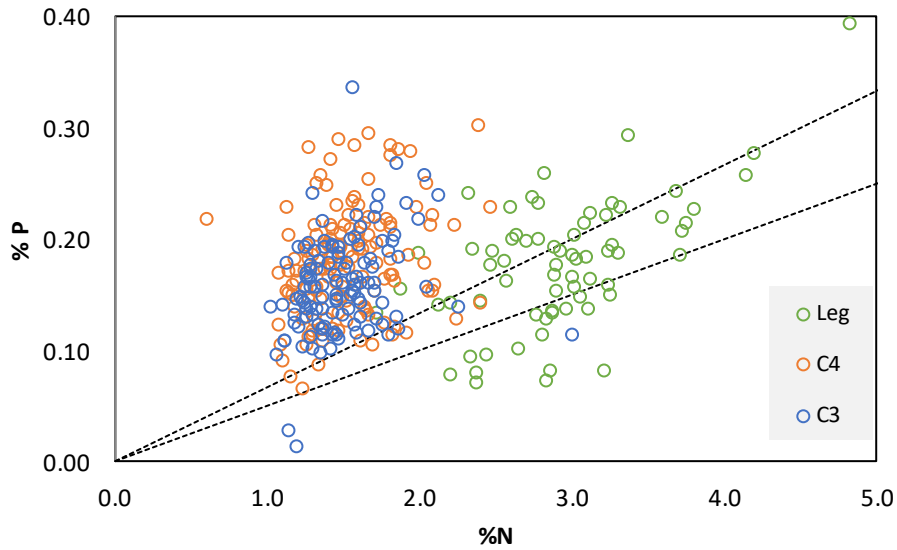


Figura 5. Relación entre el contenido en planta de N y P en %, para los componentes leguminosa (Leg), graminoide- C₃ (C₃) y gramínea- C₄ (C₄). Líneas punteadas superior e inferior representan relaciones N:P de 15 y 20 respectivamente.

Cuadro 5. Relación entre variables del estado nutricional de los componentes de los MECN y el estado nutricional de la Leguminosa INN-Leguminosa (Índice de Nutrición Nitrogenado). INP (Índice de Nutrición Fosfatada)

Variable	INN-Leg	
	Superior ⁺	Inferior
%N- C ₃	1,60	1,4*
%N- C ₄	1,81	1,49*
INN- C ₃	0,38	0,36*
INN- C ₄	0,57	0,47*
%P- C ₃	0,17	0,16
%P- C ₄	0,22	0,17*
%P-Leg	0,25	0,14*
INP- C ₃	0,74	0,58
INP - C ₄	0,72	0,69
INP -Leg	0,63	0,45*
%FBN	66,1	75,0
Ef-FBN	9,51	1,64
INN-Leg	0,93	0,52*

⁺Superiores e Inferiores representan los valores asociados a INN-Leguminosa del 13% superiores e inferior de los datos (cuartil 1 vs 9), con un n ~10. *p<0,05

3.6. DISCUSIÓN

3.6.1. FBN en MECN en contexto

El nivel de FBN tanto en % como en Kg N Mg^{-1} determinado en los MECN evaluados se ubican por debajo de los niveles reportado para Uruguay, particularmente en los MECN que había Lotus perenne, donde en pasturas puras los niveles reportados son superiores a 80% de mayo a noviembre para *Lotus corniculatus* y *Trifolium repens*⁽³²⁾. Por otra parte, la eficiencia de fijación (Ef-FBN) en general y para cada grupo de leguminosa en particular muestra un nivel inferior, con una reducción mayor al 15% para el caso de Trébol y del 27% para Lotus respecto de lo reportado⁽³²⁾. Cuando se compara con pasturas mezclas sembradas de leguminosa y Festuca, se reportan %FBN altos para Trébol blanco entre 70-90%, mientras que para *L. corniculatus* entre 66-93%⁽³¹⁾. En ningún casos se registra valores inferiores al 50 % FBN⁽³¹⁾, mientras que en los MECN más de un tercio de los casos muestra niveles inferiores a 50% (Figura 3a). A nivel internacional existen muchas evaluaciones con Trébol blanco en ambientes muy diferentes y bajo condiciones muy diversas, pero en general con altos potenciales de FBN, ~70-75%^(44,45), mientras que para especies del género Lotus hay menos estudios. Evaluaciones a nivel de campo sobre Trébol blanco en sistemas lecheros al sureste de Australia reportan para suelos arenoso y franco niveles de %FBN de 67% y 60%, y una Ef-FBN de 8,2 y 7,3 respectivamente⁽⁸⁾. Estos niveles similares a los obtenidos en nuestro trabajo para el caso de %FBN, pero menos de la mitad para Ef-FBN, considerando además que los MECN tienen una base de Lotus principalmente.

3.6.2. Rol de la nutrición en la FBN

La asociación entre el %FBN y Ef-FBN con las variables de suelo fue de moderada a baja en general mostrando limitada capacidad de explicar la variabilidad observada. Existe sin embargo una tendencia clara para K al comparar valor superiores e inferiores de %FBN, esto es concordante con estudios previos que señalan el efecto del K en el número, la masa y la actividad de los nódulos, explicada en gran medida por un incremento en la relación N:K y por el mecanismo de autorregulación de N⁽⁹⁾. Para el resto de las variables medidas que no se encontró efecto a pesar de los antecedentes previos, es posible que el nivel de análisis en suelo y el nivel donde ocurren los procesos de absorción de nutrientes (rizosfera) no son compatibles⁽⁴⁶⁾, además de las limitantes intrínsecas de cada análisis. La escasa asociación entre el P extractable en suelo y el %FBN, difiere de otros estudios con evaluaciones a gran escala a nivel de potrero para pasturas y cultivos^(13,47). Existe una relación positiva con la FBN y el nivel de P agregado por fertilización al igual que reportado en otros estudios⁽¹⁰⁾ aunque otros autores señalan que el %FBN no es mayormente afecto y si se afecta la productividad de la leguminosa⁽⁴⁸⁾. La concentración de P en la leguminosa tiene un efecto directo en %FBN, Ef-FBN y INN de la leguminosa, siempre que se compara los niveles superiores e inferiores para las tres variables (Cuadro 4, 5 y 6), al igual que el %P en el componente gramínea- C₄ (información no mostrada para %FBN y Ef-FBN). Aunque, si se analiza el grado de asociación de %P en leguminosa a través de regresiones lineales simples es significativa ($p < 0,01$) para Ef-FBN y INN, no así para %FBN. Para P y K podría considerarse que opera el mecanismo de regulación negativa del N propuesto por Divito y Sadras (2014) por un incremento en la relación N:P, N:K y una acumulación relativa de N que inhibe la FBN⁽⁹⁾. En los MECN evaluados esta idea es sustentada además por un aumento (ns) en el %N y la relación N:P de la leguminosa en los niveles inferiores sobre los superiores de %FBN y Ef-FBN.

3.6.3. N del suelo y estado nutricional de las plantas

El N disponible en suelo tienen un rol central en la nutrición nitrogenada de todos los componentes de la comunidad incluso de la leguminosa. El INN de leguminosa es independientemente del nivel FBN, donde %FBN es 66 vs 75 % (ns) para los casos de mayor y menor nivel de INN respectivamente (Cuadro 6). Al igual que proponen Soussana y Tallec (2009), el nivel de FBN se reduce cuando el INN de la leguminosa está cercano a 1 o superior, y la reducción es mayor cuanto mayor es la disponibilidad de NO_3^- del suelo⁽³⁵⁾. La transferencia de N de la leguminosa a las no-leguminosas en el corto plazo y de manera directa parece limitada, aunque esto ha sido ampliamente reportado⁽⁴⁹⁾. El %FBN actual también puede estar afectado por el nivel de acumulación de N previamente fijado por la leguminosa, dado que la mayoría de los MECN estudiados tienen varios años desde la siembra (14 años en promedio). Este efecto es posible de observar cuando se comparan los niveles de $\delta^{15}\text{N}$ tanto para las gramíneas C_4 como para los graminoides C_3 , (media de 2,8 y 3,9 respectivamente), con a las referencias locales para suelos sobre Campo Natural sin leguminosas incorporadas 5,5 en el N de la POM y 7,5 en MOAM⁽⁵⁰⁾ (Figura 6).

La relación N:P se hace muy baja para la C_4 y C_3 por diferentes mecanismos, por un lado, la fertilización P eleva mucho la concentración de P en planta en los componentes del Campo Natural, en muchos casos asociado a un consumo de lujo (Cardozo, et al. sf., Cap-2). Por otro lado, el nivel de N que entra al sistema y que efectivamente es utilizado por el resto de la comunidad vegetal no es lo suficiente para abastecer toda la demanda de N, los valores de N:P para C_4 y C_3 en MECN son similares que los niveles de CN sin agregado de fertilizante (Cardozo, et al. sf., Cap-2).

Histograma $\delta^{15}\text{N}$

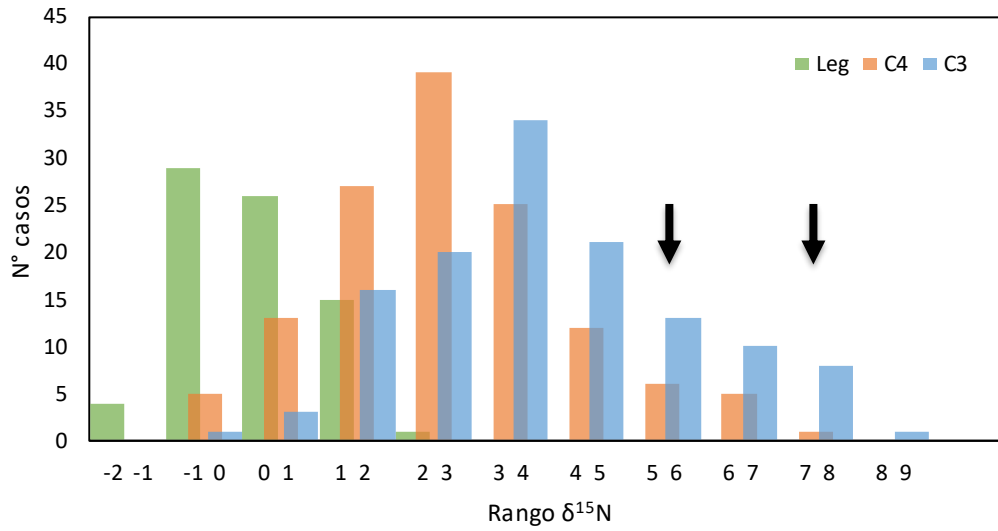


Figura 6. Histograma de frecuencia absoluta de $\delta^{15}\text{N}$ para los componentes leguminosa (Leg), graminoide- C_3 (C_3) y gramínea- C_4 (C_4). Flechas negras indican el valor reportado para suelos de Campo Natural de Uruguay, para las fracciones POM y MOAM⁽⁵⁰⁾.

3.7. CONCLUSIONES

La alta frecuencia de casos con bajos niveles de %FBN y Ef-FBN muestran que existen limitaciones en la asociación biológica entre leguminosas y bacterias en los MECN. Factores edáficos, del estatus nutricional de la planta, así como del clima afectan la FBN, pero ninguno de manera medular dada la gran variabilidad presente. La escasa correlación entre el %FBN y los índices nutricionales sugieren que el N del suelo funciona como mediador entre ellos y tiene una importancia relativa mayor en determinar el estatus nitrogenado de la leguminosa. El bajo valor de la relación N:P para C₄ y C₃ indica una limitación relativa de N en los MECN a pesar del nitrógeno incorporado vía FBN. Comprender con más detalle las causas del bajo nivel de FBN, considerando aspectos de los microorganismos involucrados, del nivel de acumulación de nitrógeno en el suelo y el impacto que la FBN tiene en los componentes no leguminosos es un punto clave para darle sostenibilidad a la producción de estos pastizales semi naturales.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

1. Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton M, Cape JN, Reis S, et al. The global nitrogen cycle in the 21th century. *Philosophical Trans R Soc London, B Biol Sci.* 2013;368:20130165.
2. Ledgard S, Giller KE. Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. In: Bacon PE, editor. *Nitrogen fertilisation in the environment.* New York, US: Marcel Decker Inc.; 1995. p. 443–486.
3. Luscher A, Mueller-Harvey I, Soussana JF, Rees RM, Peyraud JL. Potential of legume-based grassland – livestock systems in Europe : a review. *Grass Forage Sci.* 2014;69:206–28.
4. Ledgard SF, Steele KW. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant Soil.* 1992;141(1–2):137–53.
5. Chalk PM, Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S. Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by ¹⁵N dilution. *Plant Soil.* 2010;328(1):1–16.
6. Signorelli S, Casaretto E, Monza J, Borsani O. Combined Abiotic Stress in Legumes. In: Mahalingam R, editor. *Combined Stresses in Plants: Physiological, Molecular, and Biochemical Aspects.* Springer International Publishing Switzerland 2015; 2015. p. 1–264.
7. Unkovich M. Nitrogen fixation in Australian dairy systems: Review and prospect. *Crop Pasture Sci.* 2012;63:787–804.
8. Riffkin PA, Quigley PE, Kearney GA, Cameron FJ, Gault RR, Peoples MB. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Aust J Agric Res.* 1999;50(2):261–72.

9. Divito GA, Sadras VO. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *F Crop Res.* 2014;156:161–71.
10. Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Lüscher A. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *J Exp Bot.* 2000;51(348):1289–97.
11. Zanetti S, Hartwig UA, Lüscher A, Hebeisen T, Frehner M, Fischer BU, et al. Stimulation of Symbiotic N₂ Fixation in *Trifolium repens* L. under Elevated Atmospheric pCO₂ in a Grassland Ecosystem. *Plant Ecol.* 1996;112:575–83.
12. Ledgard SF, Sprosen MS, Penno JW, Rajendram GS. Nitrogen fixation by white clover in pastures grazed by dairy cows: Temporal variation and effects of nitrogen fertilization. *Plant Soil.* 2001;229(2):177–87.
13. Schipanski ME, Drinkwater LE. Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant Soil.* 2012;357(1):147–59.
14. Schwinning S., Parsons A. J. Analysis of the Coexistence Mechanisms for Grasses and Legumes in Grazing Systems. *Br Ecol Soc.* 1996;84(6):799–813.
15. Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, et al. An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass Forage Sci.* 2011;66:2–28.
16. Baeza S. El uso/cobertura del suelo en Uruguay y los pastizales del Río de la Plata: caracterización, análisis de sus cambios a lo largo del tiempo e impactos sobre el funcionamiento ecosistémico. Montevideo: Universidad de la República; 2016. p. 245.

17. Viglizzo EF, Jobbáy E. Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Ecológico-Ambiental. INTA. Buenos Aires, Argentina.: INTA; 2010. 106 p.
18. Andrade BO, Koch C, Boldrini II, Vélez-Martin E, Hasenack H, Hermann JM, et al. Grassland degradation and restoration: A conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. *Nat e Conserv.* 2015;13(2):95–104.
19. Trindade JPP, da Rocha DS, da Silva Volk LB. Uso da terra no Rio Grande do Sul Ano de 2017. Bagé, RS, Brasil: Embrapa Pecuária Sul; 2018. 20 p.
20. MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Información y Estadística Agropecuaria;). Censo General Agropecuario 2011. Montevideo, Uruguay; 2013. MGAP.
21. Andrade BO, Marchesi E, Burkart S, Setubal RB, Lezama F, Perelman S, et al. Vascular plant species richness and distribution in the Río de la Plata grasslands. *Bot J Linn Soc.* 2018;188(3):250–6.
22. Bilenca D, Miñarro F. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en la Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Buenos Aires, Argentina.: Fundación Vida Silvestre Argentina; 2004. 353 p.
23. Modernel P, Rossing WAH, Corbeels M, Dogliotti S, Picasso V, Tittonell P. Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environ Res Lett.* 2016;11(11):113002.
24. Bettolli ML, Altamirano Del Carmen MÁ, Cruz Brasesco G, Rudorff F, Martínez Ortiz A, Arroyo J, et al. Pastura Natural de Salto (URUGUAY): relación con la variabilidad climática y análisis de contextos futuros de

Cambio Climático. Rev Bras Meteorol. 2010;25(2):248–59.

25. Berretta EJ, Risso DF, Montossi F, Pigurina G. Campos in Uruguay. In: Lemaire G, Hodgson J, de Moraes A, Nabinger C, Carvalho P, editors. Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology. London: CABI; 2000. p. 377–94.
26. Millot JC, Risso DF, Methol R. Relevamiento de pasturas naturales y mejora extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Montevideo, Uruguay: CIAAB; 1987. p. 199.
27. Mederos B, Fillat A, Navarro G. Ensayos comparativos de distintos métodos de implantación de leguminosas en pasturas naturales. Montevideo: Revista AIA. 1958. p. 66-81.
28. Wilman D, Olmos F, Hamilton RS. The potential of seed-shedding and seedling development to contribute to the persistence of white clover (*Trifolium repens*) in grazed swards in Uruguay. J Agric Sci. 2005;143(6):493–501.
29. Ayala W, Carámbula M. El valor Agronómico del Género Lotus. Montevideo, Uruguay: INIA; 2009. 424 p.
30. Escaray FJ, Menendez AB, Gárriz A, Pieckenstain FL, Estrella MJ, Castagno LN, et al. Ecological and agronomic importance of the plant genus Lotus. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. Plant Sci. 2012;182(1):121–33.
31. Mallarino AP, Wedin WF, Goyenola RS, Perdomo CH, West CP. Legume Species and Proportion Effects on Symbiotic Dinitrogen Fixation in Legume-Grass Mixtures. Agron J. 1990;82:785–9.

32. García JA, Labandera C, Pastorini D, Curbelo S. Fijación de Nitrógeno por Leguminosas en La Estanzuela. In: Morón A, Risso DF, editors. Nitrogeno en pasturas. Serie Tecn. Montevideo, Uruguay: INIA; 1994. p. 13–8.
33. Sadras VO, Lemaire G. Quantifying crop nitrogen status for comparisons of agronomic practices and genotypes. *F Crop Res.* 2014;164(1):54–64.
34. Lemaire G, Jeuffroy MH, Gastal F. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur J Agron.* 2008;28(4):614–24.
35. Soussana JF, Tallec T. Can we understand and predict the regulation of biological N₂ fixation in grassland ecosystems? *Nutr Cycl Agroecosystems.* 2010;88(2):197–213.
36. Peoples MB, Chalk PM, Unkovich MJ, Boddey RM. Can differences in ¹⁵N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? *Soil Biology and Biochemistry.* 2015.
37. Koersemlan W, Meuleman AF. The vegetation N : P ratio : a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *J Appl Ecol.* 1996;33(6):1441–50.
38. Güsewell S. N : P ratios in terrestrial plants : variation and functional significance. *New Phytol.* 2004;164:243–66.
39. Sadras VO. The N:P stoichiometry of cereal, grain legume and oilseed crops. *F Crop Res.* 2006;95(1):13–29.
40. Lemaire G, Sinclair T, Sadras V, Bélanger G. Allometric approach to crop nutrition and implications for crop diagnosis and phenotyping. A review.

Agron Sustain Dev. 2019;39(2):1–17.

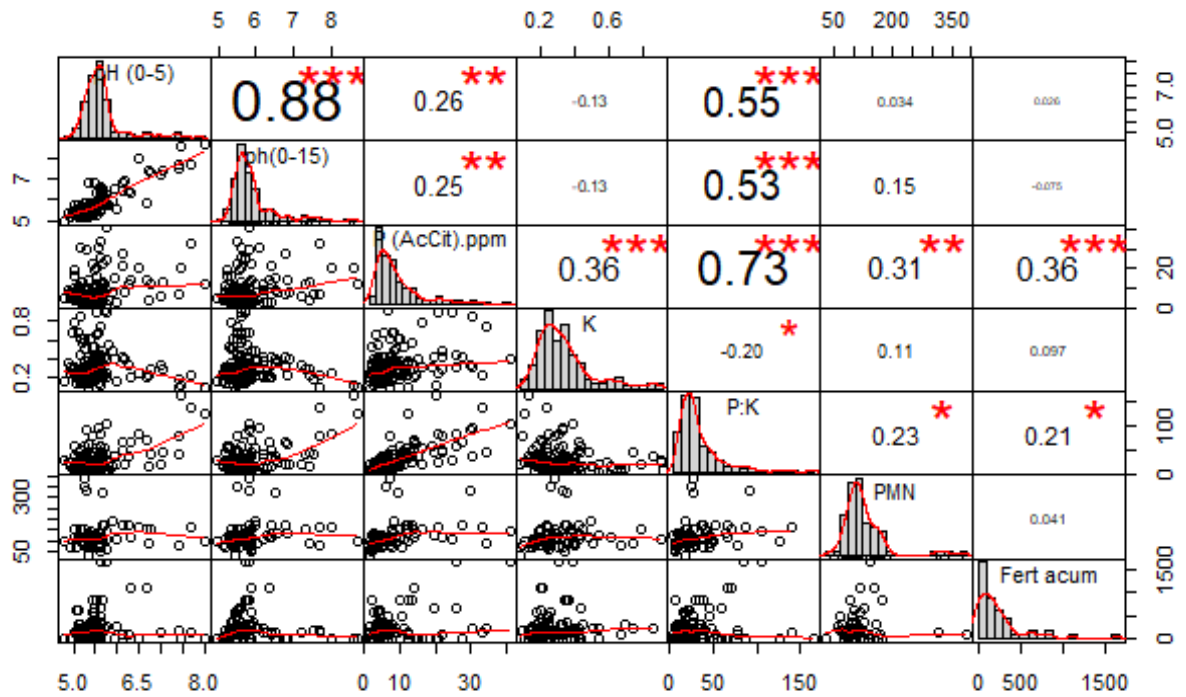
41. Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey B, Giller K, et al. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *Aust Cent Int Agric Res.* 2008. 258 p.
42. Casanova D. Yield gap analysis in relation to soil properties in direct-seeded flooded rice. *Geoderma.* 1999 Sep 1;91(3-4):191-216.
43. Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. INFOSTAT. Córdoba, Argentina: Grupo INFOSTAT, FCA UNC; 2015. Available from: <https://www.infostat.com.ar/>
44. Ledgard SF. Nitrogen cycling in low input legume-based agriculture, with emphasis on legume/grass pastures. *Plant Soil.* 2001;228(1):43–59.
45. Carlsson G, Huss-Danell K. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant Soil.* 2003;253(2):353–72.
46. Marschner P. Rhizosphere Biology. In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. Elsevier Ltd; 2011. p. 369–88.
47. Collino DJ, Salvagiotti F, Peticari A, Piccinetti C, Ovando G, Urquiaga S, et al. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. *Plant Soil.* 2015;392(1–2):239–52.
48. Peoples MB, Brockwell J, Hunt JR, Swan AD, Watson L, Hayes RC, et al. Factors affecting the potential contributions of N₂ fixation by legumes in Australian pasture systems. *Crop Pasture Sci.* 2012;63(January):759–86.
49. Thilakarathna MS, Mcelroy MS, Chapagain T, Papadopoulos YA, Raizada MN. Belowground nitrogen transfer from legumes to non-legumes under

managed herbaceous cropping systems . A review. *Agron Sustain Dev.* 2016;34(58).

50. Bondaruk V. ¿La introducción de leguminosas exóticas en pastizales naturales modifica el contenido de C y N orgánico del suelo? Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía; 2017.

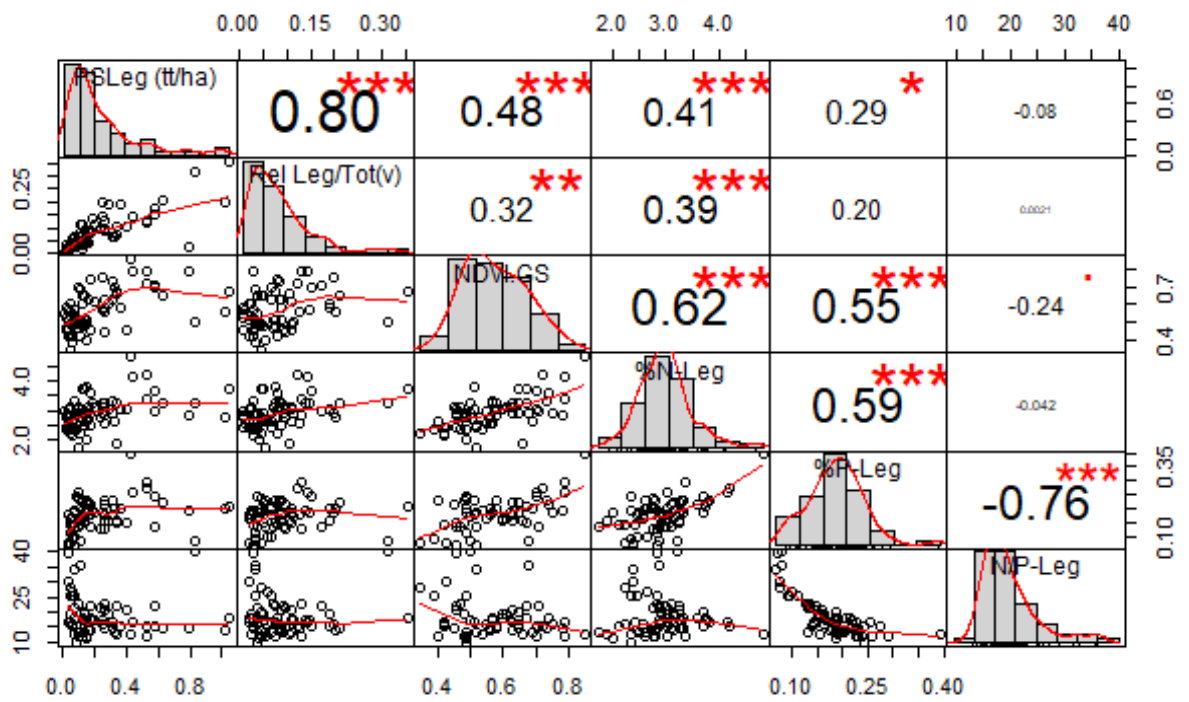
3.9. ANEXOS

Figura A1. correlación entre variables auxiliares y su distribución para suelo.



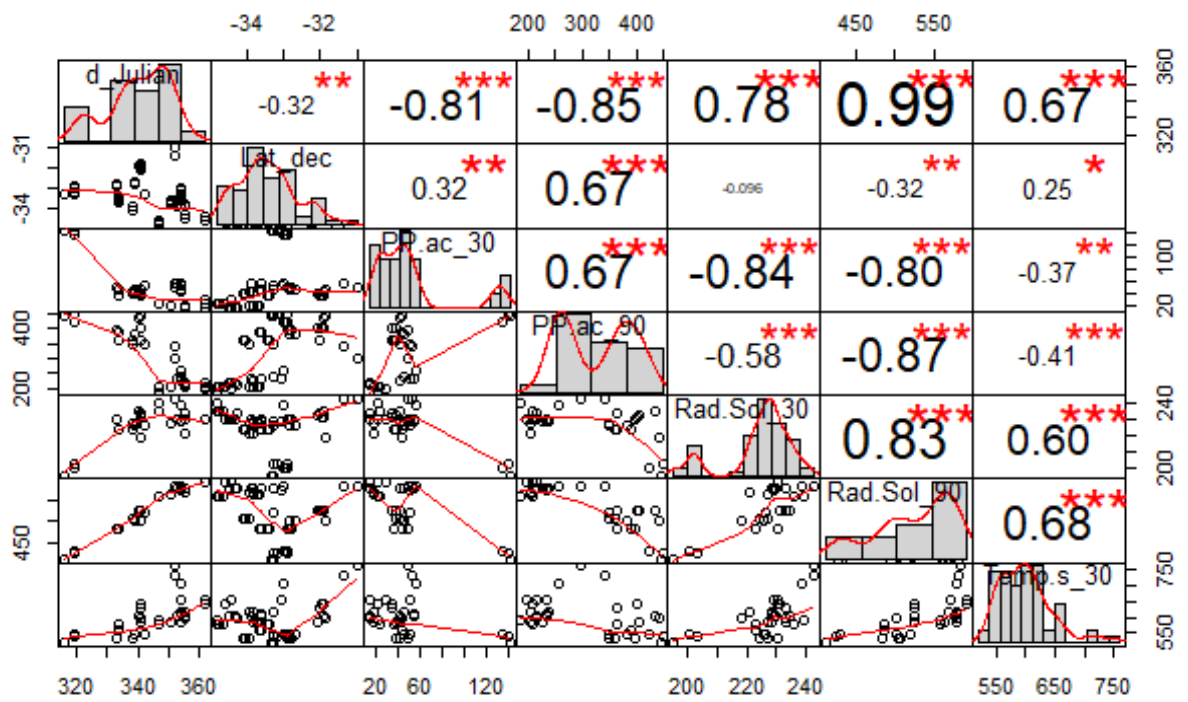
p-values (***) < 0, 0.001, ** < 0.01, * < 0.05)

Figura A2 correlación entre variables auxiliares y su distribución para estado de la leguminosa.



p-values (***<0, 0.001, **<0.01, *<0.05)

Figura A3 correlación entre variables auxiliares y su distribución para clima.



p-values (***) $<0, 0.001$, (**) <0.01 , (*) <0.05)

Cuadro A4. Propiedades de componentes vegetales asociadas a las muestras recolectadas en todo el territorio uruguayo.

Variable	n	Media	DS	Min	Max
<i>Leguminosa</i>					
N	75	2,91	0,54	1,73	4,83
P	69	0,18	0,06	0,07	0,39
N:P	69	18,2	6,5	9,7	40,0
C:N	75	15,9	3,0	8,9	26,7
C:P	69	288,0	117,5	110,3	643,1
C:N:P	69	44.9:2.9:0.2			
<i>Gramíneas - C₄</i>					
N	138	1,54	0,31	0,61	2,47
P	137	0,18	0,05	0,06	0,30
N:P	137	9,2	3,0	2,8	19,0
C:N	138	29,4	5,5	17,9	41,7
C:P	137	267,2	89,5	78,1	747,3
C:N:P	137	43.8:1.5:0.2			
<i>Graminoides - C₃</i>					
N	130	1,50	0,27	1,02	3,00
P	118	0,16	0,04	0,09	0,34
N:P	118	9,9	2,8	4,6	26,4
C:N	130	30,2	4,8	15,1	42,7
C:P	118	293,1	72,8	128,9	467,8
C:N:P	118	44,2:1,5:0,2			

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La revisión cuantitativa a través de las técnicas de metaanálisis, permitieron avanzar sobre el conocimiento de la dinámica del fósforo en los pastizales del Río de la Plata. Partiendo de la hipótesis que la productividad de este ecosistema se encuentra fuertemente limitada por la disponibilidad de P en los suelos, vemos que los resultados prestados en el Capítulo 2 (artículo 1) hacen refutar esta aseveración. La fertilización fosfatada no tuvo efecto en casi 40% de los casos compilados. La concentración de P del forraje se incrementó con más frecuencia (54 vs 31% de respuestas independientes), y en mayor medida (55 vs 27% del efecto medio relativo), por la fertilización P, en comparación con PPNA. La proporción N:P del forraje se redujo por la fertilización P en 61% de los casos y con un efecto medio del 32%. El P del suelo, el nivel de P de la planta, el pH del suelo y la dosis de fertilizante representaron el 70% de la variación en las respuestas a la fertilización en la concentración del forraje P y el 81% de la proporción N: P del forraje. Solo el 5% de la variación en la respuesta en la PPNA a la fertilización con P se explicó con cualquier combinación de todas las variables explicativas compiladas. Estos resultados indican que, a pesar del bajo nivel de P disponible en el suelo, el PPNA de los pastizales del Río de la Plata no está limitado en gran medida por la disponibilidad de P. Además, las relaciones N:P generalmente baja en los tratamientos no fertilizados (90% por debajo de 14: 1; 65% por debajo de 10,5: 1) sugieren que los pastizales en este bioma estarían más limitados por una deficiencia generalizada de N.

El estudio de situaciones reales a escala regional permitió avanzar en el conocimiento sobre el funcionamiento de un proceso clave para los MECN, que es la FBN. A pesar de la alta variabilidad que acompaña a estos estudios de carácter observacional, es posible identificar patrones que refuerzan procesos ampliamente descritos en la literatura, como también generan nuevas interrogantes sobre aspectos menos estudiados. La alta frecuencia de casos con bajos niveles de %FBN y Ef-FBN muestran que existen limitaciones en la asociación biológica entre leguminosas y

bacterias en los MECN. Factores edáficos, del estatus de la planta, así como del clima afectan la FBN, pero ninguno de manera fundamental dada la gran variabilidad presente. La escasa correlación entre el %FBN y los índices nutricionales sugieren que el N del suelo funciona como un amortiguador entre ellos y tiene una importancia relativa mayor para la leguminosa. El bajo valor de la relación N:P para C₄ y C₃ indica una limitación relativa de N en los MECN a pesar de la entrada de N vía FBN.

4.1. COMPARACIÓN GLOBAL

Si se analiza de forma conjunta todas las bases de datos presentadas en ambos artículos, focalizando en la concentración de N, de P y su relación, es posible observar patrones acordes a lo esperado y otros que no. La concentración de N de un conjunto de datos adicionales (n=30) de MECN analizados en el Laboratorio de Nutrición Animal de “La Estanzuela”, muestran un valor intermedio entre los valores de la Leguminosa y los valores de las gramíneas C₄ y gramínoideas C₃, lo que resulta lógico. Por su parte, no hay diferencias entre ambas (C₄ y C₃) y los datos del Laboratorio de LE para CN promedio y si presentan valores superiores a los CN degradados. Para los pares de CN fertilizados con P, el valor de N no varía entre ellos, pero si se ubican con un %N intermedio entre los CN promedio y los CN degradados. Al analizar la concentración de P se ve menos diferencias entre los sets de datos, dado el gran solapamiento entre las mismas. De todos modos, es posible diferenciar el efecto de la fertilización P en los pares de CN, donde el control no fertilizado es más bajo que el fertilizado y parecido a los CN degradados. Los MECN del Laboratorio-LE se ubican en un nivel superior que los CN promedio y entre ellos aparecen todos los componentes de los MECN relevados en el artículo 2. En referencia a la relación N:P, se puede identificar claramente que para las muestras compuestas o de gramíneas la mayor parte de ellas se ubican por debajo del nivel 15 en más de un 93% de los casos y por debajo de 10 en 54%. Para la leguminosa como fue señalado anteriormente hay situaciones de mayor deficiencia de N, P y ambas.

Por último, es posible identificar un límite biológico en torno a una relación N:P de 4 de máxima capacidad de acumulación de P en planta (Figura 4).

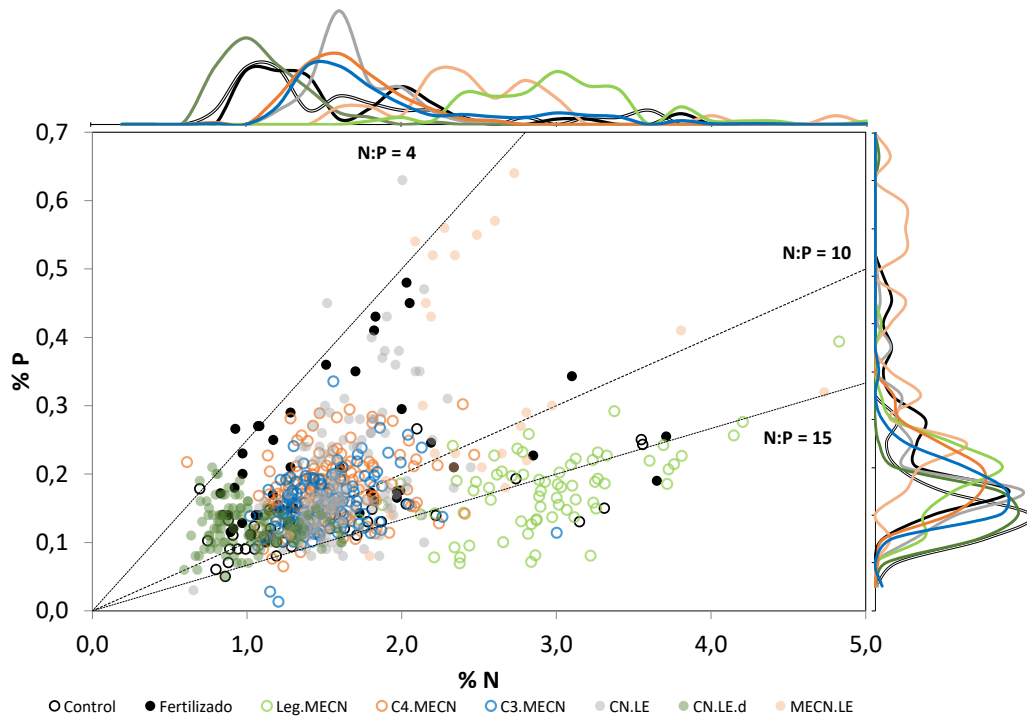


Figura 4. Relación entre el contenido en planta de P y N, e histograma relativo para cada una de las variables por separado, para todos los tipos de pasturas analizados en los 2 artículos

5. CONCLUSIONES

Los pastizales del Río de la plata son un ecosistema que no está limitado mayormente por la disponibilidad de fósforo, la gran adaptación de las plantas a este ambiente explica esto a pesar del bajo nivel de P extractables. Después de la limitación por agua, el nitrógeno parece ser la mayor limitante para la producción y no el fósforo. La fertilización P induce en general, una mayor deficiencia de N genera un consumo de lujo y solo afecta positivamente algunas situaciones de alto potencial de crecimiento. Por su parte la introducción de leguminosas en el CN más la fertilización P, generan los MECN, en los cuales se espera una gran entrada de N al sistema vía FBN. Este proceso evaluado a escala regional mostro niveles muy variados de funcionamiento, en general con un impacto moderado en la nutrición de la leguminosa y bajo en el resto de la comunidad no leguminosa. Algunos factores parecen influenciar este proceso, pero ninguno de manera principal. El P si bien es considerado un factor determinante del desempeño de la leguminosa y de la FBN, aparece algo difuso dado que el P extractable no tiene efecto y el P en planta y el nivel de fertilización P tienen bajo impacto. El N del suelo en los MECN es quien determina el estado nutricional de todos los componentes, sin embargo, es difícil estimar que proporción del N del suelo es producto de la FBN pretérita, dada que en muchas situaciones se acumula más de 30 años de aporte de leguminosa.

El avance en términos cuantitativo presentado en estos trabajos permiten avanzar en la modelación y parametrización de algunas relaciones centrales en la dinámica de producción de los MECN. También quedan planteadas interrogantes a abordar con trabajos manipulativos a diferentes escalas para entender algunos procesos, en particular la dinámica de transferencia de N desde la leguminosa al resto de la comunidad, así como también los efectos de la acumulación de N derivado de la FBN y de la fertilización P en la productividad de todos los componentes, así como de su estado nutricional. La literatura sobre interacción entre leguminosas templadas y gramíneas subtropicales C₄ es escasa, por tanto, se hace necesario profundizar sobre el conocimiento de este sistema particular para que el manejo

capitalice los efectos positivos y minimice los negativos de cualquier proceso de intensificación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, McIvor J, Milne J, Morris C, Peeters S, Sanderson M. 2011. An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass and Forage Science*, 66, 2–28.
- Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Lüscher A. 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51(348), 1289–1297.
- Andrade BO, Marchesi E, Burkart S, Setubal R B, Lezama F, Perelman S, Schneider AA, Trevisan R, Overbeck GE, Boldrini II. 2018. Vascular plant species richness and distribution in the Río de la Plata grasslands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(3), 250–256.
- Andrade BO, Koch C, Boldrini II, Vélez-Martin E, Hasenack H, Hermann JM, Kollmann J, Pillar VD, Overbeck GE. 2015. Grassland degradation and restoration: A conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. *Natureza e Conservacao*, 13(2), 95–104.
- Astori, D., Alonso, J., Coll, J., Peixoto, C. 1979. La evolución tecnológica de la ganadería uruguaya 1930-1977. Montevideo, Uruguay. Edición de la B. Oriental.
- Ayala W, Carámbula M. 2009. El valor Agronómico del Género Lotus. Montevideo, Uruguay: INIA.
- Baeza S. 2016. El Uso/Cobertura del suelo en Uruguay y los Pastizales del Río de la Plata: caracterización, análisis de sus cambios a lo largo del tiempo e impactos sobre el funcionamiento ecosistémico. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas,

PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. Universidad de la República

Berretta EJ, Risso DF, Montossi F, Pigurina G. 2000. Campos in Uruguay. En: Lemaire G, Hodgson J, Moraes A, Nabinger C, Carvalho P. (Eds.). *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology* (Vol. 1, pp. 377–394). London: CABI.

Bettolli ML, Altamirano MA, Cruz G, Rudorff F, Ortiz AM, Arroyo J, Aroma J. 2010. Pastura Natural de Salto (URUGUAY): relación con la variabilidad climática y análisis de contextos futuros de Cambio Climático. *Revista Brasileira de Meteorología*, 25(2), 248–259.

Bilenca D, Miñarro F. 2004. Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en la Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Buenos Aires, Argentina.: Fundación Vida Silvestre Argentina.

Bray RH, Kurtz LT. 1945. Determination of Total, Organic, and Available forms of Phosphorus in Soil. *Soil Science*. Illinois.US.

Cáceres D. 2019. Cambios en el largo plazo en la salud del Campo Natural asociados a la tecnología de Mejoramientos Extensivos con *Lotus subbiflorus* cv “El rincón”. Tesis Maestría en Ciencias Ambientales. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 53 p.

Carámbula M. 1978. Producción de Pasturas. In MAP - CIAAB (Ed.), *Pasturas IV* (micelanea 18, pp. 7–10). Montevideo, Uruguay: CIAAB.

Carvalho PCF, Batello C. 2009. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos biome: The natural grasslands dilemma. *Livestock Science*, 120(1–2), 158–162.

- Chalk PM, Inácio CT, Chen D. 2019. An overview of contemporary advances in the usage of ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) as a tracer of agro-ecosystem N cycle processes that impact the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 283(February), 106570.
- Chalk PM, Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S. 2010. Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependence estimated by ^{15}N dilution. *Plant and Soil*, 328(1), 1–16.
- 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(1–2), 239–252. doi:10.1007/s11104-015-2459-8
- Craine JM, Brookshire ENJ, Cramer MD, Hasselquist NJ, Koba K, Marin-Spiotta E, Wang L. 2015. Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils. *Plant and Soil*, 396(1–2), 1–26.
- Craine JM, Morrow C, Stock WD. 2008. Nutrient concentration ratios and co-limitation in South African grasslands. *New Phytologist*, 179(3), 829–836.
- Darwich NA. 1983. Niveles de fosforo asimilable en los suelos pampeanos. IDIA, Informativo de Investigaciones Agrícolas, 1–5.
- Del Pino A., Rodríguez T, Andión J. 2016. Production improvement through phosphorus fertilization and legume introduction in grazed native pastures of Uruguay. *Journal of Agricultural Science*, 154(2), 347–358.
- 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.

- Drew EA, Denton MD, Sadras VO, Ballard RA. 2012. Agronomic and environmental drivers of population size and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in Mediterranean-type environments. *Crop and Pasture Science*, 63(5), 467–477. doi:10.1071/CP12032
- Escaray FJ, Menendez AB, Gárriz A, Pieckenstain FL, Estrella MJ, Castagno LN, Carrasco P, Sanjuán J, Ruiz OA. 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(1), 121–133.
- Ferreira ET, Nabinger C, Adelaide D, Elejalde G, De Freitas K, Carassai IJ, Schmitt F. 2011. Fertilization and oversowing on natural grassland: effects on pasture characteristics and yearling steers performance. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(9), 2039–2047.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton M, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M. 2013. The global nitrogen cycle in the 21st century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B Biological Sciences*, 368, 20130165.
- García JA, Labandera C, Pastorini D, Curbelo S. 1994. Fijación de nitrógeno por leguminosas en La Estanzuela. In Morón A y Risso DF (Eds.). *Nitrógeno en pasturas*. Montevideo, Uruguay: INIA. (Serie Técnica) 13–18.
- Gardi C, Angelini M, Barceló S, Comerma J, Cruz Gaistardo C, Encina Rojas A, Jones A, Krasilnikov P, Mendoca Santos Brefin ML, Montanarella L, Muñiz Ugart O, Scahd P, Vara Rodríguez MI, Vargas, R. 2014. *Atlas de suelos de América Latina y el Caribe*. Luxemburgo: Unión Europea.

- Gastal F, Lemaire G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 789–799.
- Gong XY, Chen Q, Dittert K, Taube F, Lin S. 2011. Nitrogen, phosphorus and potassium nutritional status of semiarid steppe grassland in Inner Mongolia. *Plant and Soil*, 340(1–2), 265–278.
- Güsewell S. 2004. N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist*, 164, 243–266.
- Gutiérrez, P. 2017. Evaluación de Rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de *Trifolium repens*. Tesis Maestría. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 100 p.
- Hatchondo J. 1958. Efectos de fertilizantes en campo natural. Montevideo: Revista AIA, 18–23.
- Hernández J, Zamalvide JP. 1998. Procesos de retención de fosforo por los suelos evaluados a través de parámetros de suelo y planta. *Agrociencia (Montevideo)*, 1(2), 48–63.
- Hernández J, Otegui O, Zamalvide JP. 1995. Formas y contenidos de fósforo en algunos suelos del Uruguay (No. 43). Universidad de la República, Facultad de Agronomía.
- Hogberg P. 1997. Tansley review No. 95: ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*, 137(95), 179–203.
- Jaurena M, Lezama F, Salvo L, Cardozo G, Ayala W, Terra J, Nabinger C. 2016. The Dilemma of Improving Native Grasslands by Overseeding Legumes:

Production Intensification or Diversity Conservation. *Rangeland Ecology and Management*, 69(1).

Koersemlan W, Meuleman AF. 1996. The vegetation N:P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *The Journal of Applied Ecology*, 33(6), 1441–1450.

Ledgard SF, Sprosen MS, Penno JW, Rajendram, GS. 2001. Nitrogen fixation by white clover in pastures grazed by dairy cows: Temporal variation and effects of nitrogen fertilization. *Plant and Soil*, 229(2), 177–187.

Ledgard SF. 2001. Nitrogen cycling in low input legume-based agriculture, with emphasis on legume/grass pastures. *Plant and Soil*, 228(1), 43–59.

Ledgard SF, Giller KE. 1995. Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. In: Bacon PE (Ed.), *Nitrogen fertilization in the environment* (pp. 443–486). New York, US: Marcel Decker Inc.

Ledgard SF, Steele KW. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil*, 141(1–2), 137–153.

Lemaire G, Sinclair T, Sadras V, Bélanger G. 2019. Allometric approach to crop nutrition and implications for crop diagnosis and phenotyping. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 39(2), 1–17.

Lemaire G, Jeuffroy MH, Gastal F. 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *European Journal of Agronomy*, 28(4), 614–624.

- Li Y, Niu S, Yu G. 2016. Aggravated phosphorus limitation on biomass production under increasing nitrogen loading: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 22(2), 934–943.
- Luscher 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.
- Macedo W. 1984. Levantamento de reconhecimento dos solos do município de Bagé, RS, Brasil: EMBRAPA-UEPAE.
- Mallarino A, Sawyer JE, Barnhart SK. 2013. A General Guide for Crop Nutrient and Limestone Recommendations in Iowa. Department of Agronomy, Iowa State University (Extension, Vol. 82). Iowa, US: Iowa State University.
- 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.
- Mederos B, Fillat A, Navarro G. 1958. Ensayos comparativos de distintos métodos de implantación de leguminosas en pasturas naturales. Montevideo: Revista AIA, 66-81.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2013. Censo General Agropecuario 2011. Montevideo, Uruguay: MGAP. 142 p.
- MGAP-OPYPA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca – Oficina de Programación y Política Agropecuaria). 2018. Resultados de la Encuesta Ganadera Nacional 2016. Montevideo, Uruguay: MGAP. 62 p.

- Millot JC, Risso DF, Methol R. 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejora extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Montevideo, Uruguay: CIAAB.
- Modernel P, Rossing WAH, Corbeels M, Dogliotti S, Picasso V, Tittonell P. 2016. Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters*, 11(11), 113002.
- Nabinger C, de Moraes A, Maraschin GE. 2000. Campos in southern Brazil. En: Lemaire G, Hodgson J, Moraes A, Nabinger C, Carvalho P. (Eds.). *Grassland ecophysiology and grazing ecology* (pp. 355–376). London: CABI.
- Oliveira LB, Soares EM, Jochims F, Tiecher T, Marques AR, Kuinchtner BC, Rheinheimer DS, de Quadros FLF. 2015. Long-term effects of phosphorus on dynamics of an overseeded natural grassland in Brazil. *Rangeland Ecology and Management*, 68(6), 445–452.
- 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 neighbouring non-legume plant species? *Soil Biology and Biochemistry*.
- Quincke A, Cuadro R. (Eds). 2019. Fertilización de pasturas de leguminosas: resultados para el manejo del fósforo y el azufre. Montevideo: INIA. (Serie Técnica, 248), 60 p. c10.35676/INIA/ST.248
- Riffkin PA, Quigley PE, Kearney GA, Cameron FJ, Gault RR, Peoples MB. 1999. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in southwestern Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research*; 50(2):261–72.
- Risso DF, Berrett, EJ. (Eds.). 2001. Tecnología forrajeras para sistemas ganaderos de Uruguay. Montevideo: INIA. (INIA Boletín de Divulgación; 76)

- Risso D, Berretta E. 1993. Animal productivity and dynamics of native pastures improved with oversown legumes in Uruguay. En: International Grassland Congress (18^o, 1993, Winnipeg and Saskatoon, Canada). Proceeding. 29–30.
- Sadras VO, Lemaire G. 2014. Quantifying crop nitrogen status for comparisons of agronomic practices and genotypes. *Field Crops Research*, 164(1), 54–64.
- Sadras VO. 2006. The N:P stoichiometry of cereal, grain legume and oilseed crops. *Field Crops Research*, 95(1), 13–29.
- Schipanski ME, Drinkwater LE. 2012. Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant and Soil*, 357(1), 147–159.
- Schwinning S, Parsons AJ. 1996. Analysis of the Coexistence Mechanisms for Grasses and Legumes in Grazing Systems. *British Ecological Society*, 84(6), 799–813.
- Signorelli S, Casaretto E, Monza J, Borsani O. 2015. Combined Abiotic Stress in Legumes. En: Mahalingam R. (Eds.). *Combined Stresses in Plants: Physiological, Molecular, and Biochemical Aspects*. Switzerland. Springer International Publishing. 123–145.
- Soca P, Ayala W, Bermúdez R. 2001. The effect of herbage allowance of *Lotus pedunculatus* cv. Grasslands Maku on winter and spring beef heifer performance. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 64, 111–114.
- Soussana JF, Tallec T. 2010. Can we understand and predict the regulation of biological N₂ fixation in grassland ecosystems? *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 88(2), 197–213.

- Thilakarathna MS, Mcelroy MS, Chapagain T, Papadopoulos YA, Raizada MN
2016. Belowground nitrogen transfer from legumes to non-legumes under
managed herbaceous cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable
Development*, 34(58).
- Tiecher T, Oliveira LB, Rheinheimer DS, Quadros FLF, Gatiboni LC, Brunetto G,
Kaminski J. 2014. Phosphorus application and liming effects on forage
production, floristic composition and soil chemical properties in the Campos
biome, southern Brazil. *Grass and Forage Science*, 69(4), 567–579.
- Trindade JPP, da Rocha DS, da Silva Volk LB. 2018. Uso da terra no Rio Grande do
Sul Ano de 2017. Bagé, RS, Brasil: Embrapa, Pecuária Sul.
- Ungerfeld E. 1998. Factores que afectan el contenido de minerales en pasturas
naturales y el estado nutricional de vacunos y ovinos en Uruguay. Edición
preliminar, INIA Tacuarembó. Tacuarembó, Uruguay.
- Unkovich M. 2012. Nitrogen fixation in Australian dairy systems: Review and
prospect. *Crop and Pasture Science*, 63(9) 787-804.
- Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey B, Giller K, Alves B,
Chalk, P. 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural
systems. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research
(ACIAR), Monograph N°136. 258 p.
- Vergutz L, Manzoni S, Porporato A, Novais RF, Jackson R. 2012. Global resorption
efficiencies and concentrations of carbon and nutrients in leaves of terrestrial
plants. *Ecological Monographs*, 82(2), 205–220.
- Viglizzo EF, Jobbáy E. 2010. Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y
su Impacto Ecológico-Ambiental (INTA). Buenos Aires, Argentina: INTA.

Wilman D, Olmos F, Hamilton RS. 2005. The potential of seed-shedding and seedling development to contribute to the persistence of white clover (*Trifolium repens*) in grazed swards in Uruguay. *Journal of Agricultural Science*, 143(6), 493–501.

Zanetti S, Hartwig UA, Lüscher A, Hebeisen T, Frehner M, Fischer BU, Hendrey GR, Blum H, Nösberger, J. 1996. Stimulation of Symbiotic N, Fixation in *Trifolium repens* L. under Elevated Atmospheric pCO₂ in a Grassland Ecosystem. *Plant Ecology*, 112, 575–583.

6. ANEXOS

Normas para Autores de la revista Global Change Biology.

https://wol-prod-cdn.literatumonline.com/pb-assets/assets/13652486/GCB_submission_for_review_checklist_August_2017-1509466288000.pdf