



Contribucion de la fijación biológica de nitrógeno en vicia y arveja

Enrico, J. M.¹; Piccinetti, C. F.²; Barraco, M. R.³; Agosti, M. B.⁴; Ecclesia R. P.⁵; Salvagiotti, F.¹

¹Manejo de Cultivos, Suelo y Agua, EEA Oliveros INTA, Ruta 11 Km 353, 2206, Oliveros, Argentina

²Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA, Las Cabañas y De los Reseros, 1712 Castelar, Argentina

³INTA EEA Gral. Villegas, San Martín 26, 6230, Gral. Villegas, Argentina

⁴GTD Chacra Pergamino, Aapresid, Dorrego 1639 Piso 2, Oficina A, 2000, Rosario, Argentina

⁵INTA EEA Paraná, Ruta 11, Km 12.5, 3100, Paraná, Argentina

Este artículo es una adaptación de parte del trabajo publicado en la revista *European Journal of Agronomy* 115 (2020) 126016. Biological nitrogen fixation in field pea and vetch: Response to inoculation and residual effect on maize in the Pampean region.

 **Palabras clave:** fijación biológica de nitrógeno, vicia, arveja.

Introducción

En Argentina el cultivo de soja (*Glycine max L*) predomina en los sistemas agrícolas, en la mayor parte de los casos como monocultivo (Caviglia y Andrade, 2010) y con largos periodos de barbecho descubierto, poniendo en riesgo la sustentabilidad de los sistemas dada la escasa cobertura y bajo aporte de residuos (Wright y Hons, 2004). Una alternativa para ocupar estos periodos invernales con cultivos e incrementar el aporte de residuos, es la incorporación de cultivos de cosecha o de cobertura (CC) (Blanco-Canqui *et al.*, 2015). La inclusión de CC durante el invierno no solo aumenta la contribución de los residuos (Blanco-Canqui *et al.*, 2015), sino que también proporciona otros servicios ecosistémicos, como la reducción de impedancias en el suelo (Villamil *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2017), disminución de la escorrentía de agua y lixiviación de nitratos (Omae y Nagumo, 2016), aumento del secuestro de carbono (Reicosky y Forcella, 1998; Blanco-Canqui, 2012) e incremento en la absorción de nutrientes (Möller *et al.*, 2008), control de la erosión del viento y el agua (Battany y Grismer, 2000) y también para albergar polinizadores y aumentar otros insectos beneficiosos (Orr *et al.*, 1997; Pullaro *et al.*, 2006).

Cuando las legumbres se incluyen como CC, además de aumentar la biodiversidad, hay una contribución de nitrógeno (N) a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Preissel *et al.*, 2015). La inclusión de leguminosas en la rotación puede mejorar la capacidad de suministro de N del suelo para los subsiguientes cultivos no leguminosos dentro de las secuencias, pero esta contribución depende de la especie de leguminosa (Büchi *et al.*, 2015), la interacción leguminosa-rizobio (Laguerre *et al.*, 2007), la producción de biomasa de las leguminosas (Collino *et al.*, 2015), la relación C/N del residuo (Quemada y Cabrera, 1995) y el objetivo por el cual se sembró la leguminosa, ie. cultivo de cobertura o cultivo para cosecha de granos (Rochester y Peoples, 2005). Además, la cantidad de N derivada de la leguminosa al cultivo posterior depende del momento en que se suprime químicamente un cultivo de cobertura de leguminosa y el contenido relativo de celulosa, hemicelulosa y lignina en la biomasa (Wagger, 1989).

La arveja (*Pisum sativum L*) y la vicia (*Vicia sativa L* o *Vicia villosa L*) sembradas como antecesores del cultivo de maíz son opciones en los sistemas soja-maíz para aumentar la ocupación del suelo y la capacidad de suministro de N del suelo (Vaughan y Evanylo, 1999). Se espera una mayor contribución de N de la vicia que de la arveja, ya que todo el N permanece en el sistema en el primer caso, mientras



que en el último solo queda parte del N en el sistema ya que una proporción del mismo se exporta con el grano. Finalmente, el impacto de incluir una leguminosa en el sistema depende de la proporción del N derivado de la fijación biológica (Peoples y Baldock, 2001). Esta contribución varía entre los agroecosistemas y la información local es crucial para hacer balances de N locales o regionales (Herridge *et al.* 2008). Collino *et al.* (2015) demostraron una sobreestimación de del balance de N en la soja de aproximadamente el 35 % cuando los valores de N derivados del FBN no se estimaron localmente. Hasta ahora, no se han realizado informes para cuantificar la contribución de la FBN en vicia y arveja en la región pampeana de Argentina.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la contribución de N derivado de FBN en vicia y arveja en diferentes condiciones ambientales de la región pampeana central.

Materiales y métodos. Generalidades y diseño de los experimentos

Se evaluó la fijación biológica de N en parcelas experimentales ubicadas en la región pampeana, entre 31,5 y 34,8 ° latitud S de norte a sur, y de 62,7 ° a 60,3 ° de largo de oeste a este (Fig. 1). Un total de 14 sitios - año (SA) de vicia y 10 SA de arveja fueron evaluados.

Todos los experimentos se realizaron sin labranza en suelos que presentaban un amplio rango de textura (Tabla 1). Para caracterizar las condiciones químicas del suelo en cada SA, se tomaron muestras compuestas de suelo (15–20 sub-muestras de suelo por muestra) a 20 cm de profundidad antes de la siembra (Tabla 1). Se realizaron determinaciones de Carbono orgánico total (Walkley y Black, 1934), fósforo P-Bray I (Bray y Kurtz, 1945), contenido de nitrato (Bremner, 1965) y pH (Reed y Cummings, 1945). El contenido de carbono se convirtió a materia orgánica (MO) usando un factor de recuperación de 0.58.

En cada SA, los experimentos se realizaron en un diseño de bloques al azar con tres o cuatro repeticiones. Se tomaron 0.5 - 1 m² de muestras de biomasa aérea de cada cultivo en cada SA. Las semillas se inocularon con un inoculante comercial a base de turba a razón de 5 g de inoculante por kg de semillas con un recuento de al menos 1×10⁸ ufc g⁻¹ de la cepa *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae* D70. A la siembra, los cultivos se fertilizaron con fósforo (P) y azufre (S). Las malezas y las plagas se controlaron químicamente siempre que fuera necesario durante la temporada.

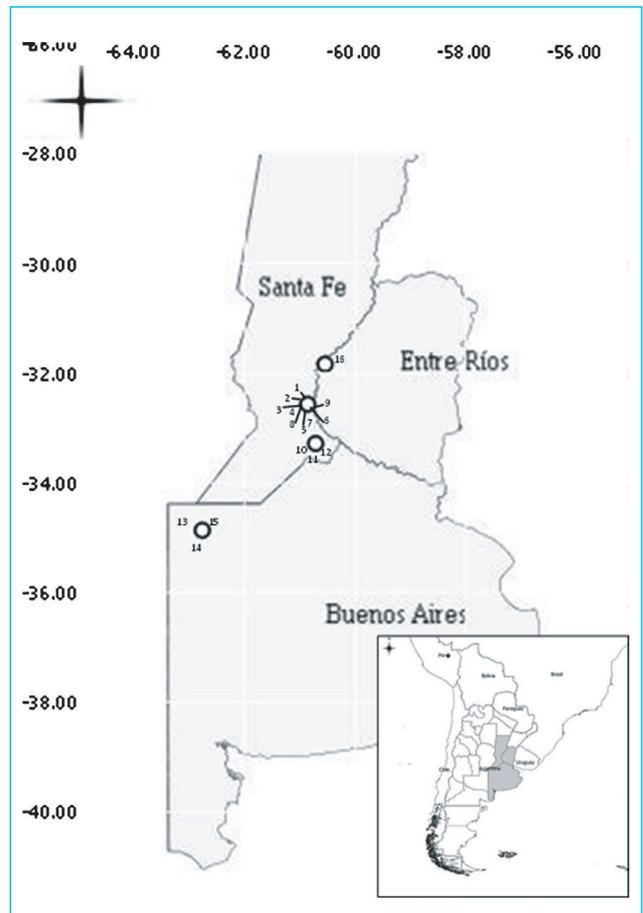


Figura 1. Área de estudio donde se determinó la FBN en vicia y arveja. Los números indican el sitio año (SA) detallado en la Tabla 1.





Tabla 1: Caracterización química inicial de los suelos a 20 cm de profundidad y del manejo de arveja y vicia en los diferentes sitio año (SA).

SA	Localidad	Campaña	Tipo de suelo	Análisis de suelo a la siembra				Manejo de Cultivo				
				P Bray 1 (mg kg ⁻¹)	pH	Materia Orgánica (g kg ⁻¹)	N-NO3 (mg kg ⁻¹)	Cultivo	Historia de Vicia/Arveja previa	Cultivar /Especie	Fecha	
										Siembra	Cosecha*	
1				15,6	5,6	20	-	Arveja Vicia		Facón sativa	29-jun 5-jun	7-nov 5-dic
2		2012-13		14,8	5,5	20	-	Arveja Vicia		Facón sativa	29-jun 5-jun	7-nov 5-dic
3				10,5	5,8	21	-	Arveja Vicia		Facón sativa	29-jun 11-jun	7-nov 5-dic
4				13,5	5,8	24	18,4	Arveja Vicia		Viper sativa	4-jun 9-may	13-nov 29-11
5	Oliveros	2013-14	Argiudol típico serie Maciel	15,0	5,4	22	-	Arveja Vicia	No	Viper sativa	4-jun 28-may	13-nov 29-11
6		2014-15		20,0	5,4	21	-	Arveja Vicia		Viper villosa	4-jul 23-jun	5-nov 16-dic
7				11,8	5,8	23	5,9	Vicia		villosa sativa	30-jun	16-dic
8		2016-17		18,0	5,9	22	-	Arveja Vicia		Viper villosa	2-ago 23-jun	21-nov 21-nov **
9				10,4	6,1	23	7,7	Arveja Vicia		Viper villosa	2-ago 23-jun	21-nov 2-dic
10		2014-15		40,3	5,2	29,2	15,5	Arveja Vicia		Facón villosa	4-jul 1-may	13-nov 8-nov
11	Uranga	2015-16	Argiudol vértico serie Peyrano	40,5	5,5	28	15,3	Arveja Vicia	Si	Facón villosa	14-jul 22-may	22-nov 1-nov
12		2016-17		21,0	5,9	29	16,3	Vicia		villosa	19-may	17-nov
13		2013-14		25,6	6,2	2,7	41,0				26-abr	18-oct
14	Gral Villegas	2015-16	Hapludol típico serie Lincoln	11,9	5,6	2,5	50,4	Vicia	No	villosa	21-abr	21-oct
15		2017-18		13,4	6,1	2,2	22,6				18-may	23-oct
16	Paraná	2014-15	Argiudol ácuico serie Tezanos Pinto	23,3	6,7		12,4	Arveja	No	Viper	16-jun	5-nov

* En cultivo de vicia Fecha de secado ** rolado del cultivo

Determinaciones realizadas. Materia seca aérea y contenido de N

En el set de experimentos I y II, en llenado de granos avanzado del cultivo de arveja, (aproximadamente 10-12 días antes de madurez fisiológica) y entre plena floración y/o inicios de llenado de granos en vicia se determinó materia seca aérea (MST) sobre una superficie de 0,5 m2. Las muestras fueron secadas en una estufa de aire forzado a 65 °C durante 72 h hasta peso constante. Se pesaron todas las muestras y se tomó una sub muestra y se molió en un molino Wiley. En la arveja se separaron las semillas de los carpelos. Se determinó la concentración de N en todas las muestras de plantas usando el procedimiento semi-micro Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973). La absorción total de N en la biomasa aérea (Nabs) se calculó como el producto de % Nt y la biomasa de cada estructura. El índice de cosecha de nitrógeno (ICN) se estimó como el cociente entre el contenido de N en el grano (N grano) y la absorción total de N (Nabs).

En todos los casos, en arveja se determinó el rendimiento de semilla (Rto) y se ajustó a un contenido de humedad estándar de 0.14 kg H2O kg grano-1.

En Oro Verde (SA16) la arveja fue utilizada como CC y no se cosecho el grano.

La fijación biológica de N se determinó utilizando el método de abundancia natural de 15N (Shearer & Kohl, 1986). Se utilizó trigo o cebada en cada parcela como planta de referencia (no fijadora de N) para la estimación de la FBN. Una sub-muestra de la molienda de materia seca se utilizó para determinar abundancia de 15N. Las muestras fueron analizadas en un analizador elemental (Carlo Erba EA1108) acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas de flujo continuo (Thermo Scientific Delta V Advantage), mediante una interfaz ConFlo IV. La proporción de N derivado del aire (%Ndfa) se determinó de acuerdo a la ecuación 1 (Högberg; 1997):

$$\%Ndfa = \frac{100 * (\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{leg})}{(\delta^{15}N_{ref} - B)} \quad \text{Ec. (1)}$$



donde $\delta^{15}N_{ref}$ es la $\delta^{15}N$ del cultivo de referencia (i.e. $\%N_{dfa}=0$), $\delta^{15}N_{leg}$ es la $\delta^{15}N$ de la leguminosa a evaluar y B es la $\delta^{15}N$ de dicha leguminosa creciendo en un medio libre de N (i.e. $\%N_{dfa}=100$). El $\%N_{dfa}$ estimado para las leguminosas evaluadas en cada año, permitió estimar la cantidad de N derivado de la FBN (N_{FBN}) a partir de la siguiente ecuación:

$$N_{FBN} \text{ (Kg ha}^{-1}\text{)} = \text{MST aérea} * \%N_t * \%N_{dfa} \quad \text{Ec. (2)}$$

Estos cálculos no tienen incluidos los aportes de N de raíces, nódulos y de la rizodeposición en el cálculo. Finalmente se estimó un balance parcial de N (Balance N) en arveja como:

$$\text{Balance N: } N_{FBN} \text{ (kg ha}^{-1}\text{)} - N_{\text{Grano}} \text{ (kg ha}^{-1}\text{)} \quad \text{Ec (3)}$$

Determinación de valor B

El valor B utilizado en la ecuación 1 fue determinado en dos experimentos en invernadero con arveja (var Facón y Viper) y vicia (Vicia sativa y Vicia villosa). Las semillas fueron inoculadas con la cepa D70 de *Rhizobium leguminosarum* vs *viciae* del cepario de colección BPCV-IMYZA INTA. Los valores B determinados para arveja fueron de: - 0.63 y - 0.33 para las variedades Facon y Viper respectivamente, y en Vicia fueron de: -0,39 y -0,75 para las sub especies villosa y sativa, respectivamente.

Análisis de la información

Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva: media, mediana y rango inter cuartil (RIC – entre los percentiles 25 y 75 %, eso representa el 50 % de todas las observaciones centradas alrededor de la mediana). Se utilizaron técnicas de regresión por cuantil para modelar relaciones empíricas entre Nabs, N_{FBN} y la biomasa aérea (Cade y Noon, 2003; Koenker y Hallock, 2001). El software Blossom (Cade y Richard, 2005) se utilizó para modelar pendientes que representan la expresión máxima y mínima de una variable dependiente en el rango de la variable independiente (cuantiles 0,99 y 0,01), y pendientes que encierran el 50% de todos los datos observados (cuantiles 0,25 y 0,75). Se compararon las pendientes medias con Test de Student.

Resultados

Producción de biomasa, absorción de N y contribución de la FBN en arveja y vicia en ambientes de región pampeana (Set de experimentos I)

El número de casos para cada cultivo fue diferente ($n=73$ y $n=52$ en vicia y arveja respectivamente), porque no todos los cultivos se sembraron en todos los SA (Tabla 1). La producción de MST aérea varió entre 676 y 7145 kg ha⁻¹ y entre 1925 y 11781 kg ha⁻¹, para arveja y vicia, respectivamente (Tabla 2). En arveja el rendimiento en grano fue en promedio de 1310 kg ha⁻¹, oscilando entre 79 y 3060 kg ha⁻¹ (Tabla 2). En promedio el cultivo de arveja absorbió 79 kg N ha⁻¹ (RIC 52-107 kg N ha⁻¹) y la vicia 159 kg N ha⁻¹ (RIC 108-196 kg N ha⁻¹). En arveja, el ICN fue del 52%, y en consecuencia representaría un retorno de N con los residuos de ca. 38 kg N ha⁻¹. La arveja presentó un $\%N_{dfa}$ promedio de 59 % (rango intercuartil 33-83 %) mientras que vicia mostro un promedio de 60 % (rango intercuartil 43-79%) (Tabla 2). Las pendientes promedio de la relación entre la producción de MST aérea y el N_{abs} fueron 42 y 36 kg de MST aérea por kg de N_{abs} en arveja y vicia, respectivamente (Figura 2 a y c), siendo significativamente diferente entre los dos cultivos ($P<0.001$). De la misma forma se observó una relación lineal y significativa entre el N_{FBN} y la MST aérea (Figura 2 b y d), donde por cada 1000 kg de MST aérea producida, se fijaron ca. 17 kg de N, sin diferencias entre cultivos ($p=0.15$). En la arveja el balance parcial de N promedio fue de 0 kg ha⁻¹ con un RIC de 13 - (- 20) kg N ha⁻¹ (Tabla 2).



Tabla 2: Estadísticos descriptivos de las variables Materia seca total (kg ha⁻¹), Nitrógeno absorbido en biomasa aérea (N_abs, kg N ha⁻¹), Fijación biológica de N (% Ndfa) y cantidad de N derivado de FBN (N_FBN, kg N ha⁻¹) para vicia y arveja, rendimiento, índice de cosecha de Nitrógeno (ICN), N en grano (kg N ha⁻¹) y balance parcial de N (BPN, kg N ha⁻¹) para arveja en el set de experimentos I.

Cultivo	Variable	Máximo	75%	Mediana	25%	Mínimo	Promedio	SE
Vicia (n=73)	MST	11781	7080	5800	4323	1925	5920	318
	N abs	321	196	156	108	40	159	9
	%Ndfa	99	79	61	43	3	60	3
	N_FBN	304	120	94	59	1	99	9
.Arveja (n=52)	MST	7145	4456	3548	2188	676	3442	201
	N abs	165	107	86	52	6	79	5
	%Ndfa	99	83	64	33	1	59	4
	N_FBN	134	71	45	11	1	46	5
	Rendimiento (*)	3060	1925	1100	716	79	1310	116
	ICN (*)	0.82	0.71	0.46	0.39	0.10	0.52	0,03
	N Grano (*)	100	68	36	23	1	42,7	4,1
Balance N (*)	69	13	5	-20	-79	0,2	4,4	

* N= 49 porque en Oro Verde (ER) no se cosecho para grano. SE= error estándar

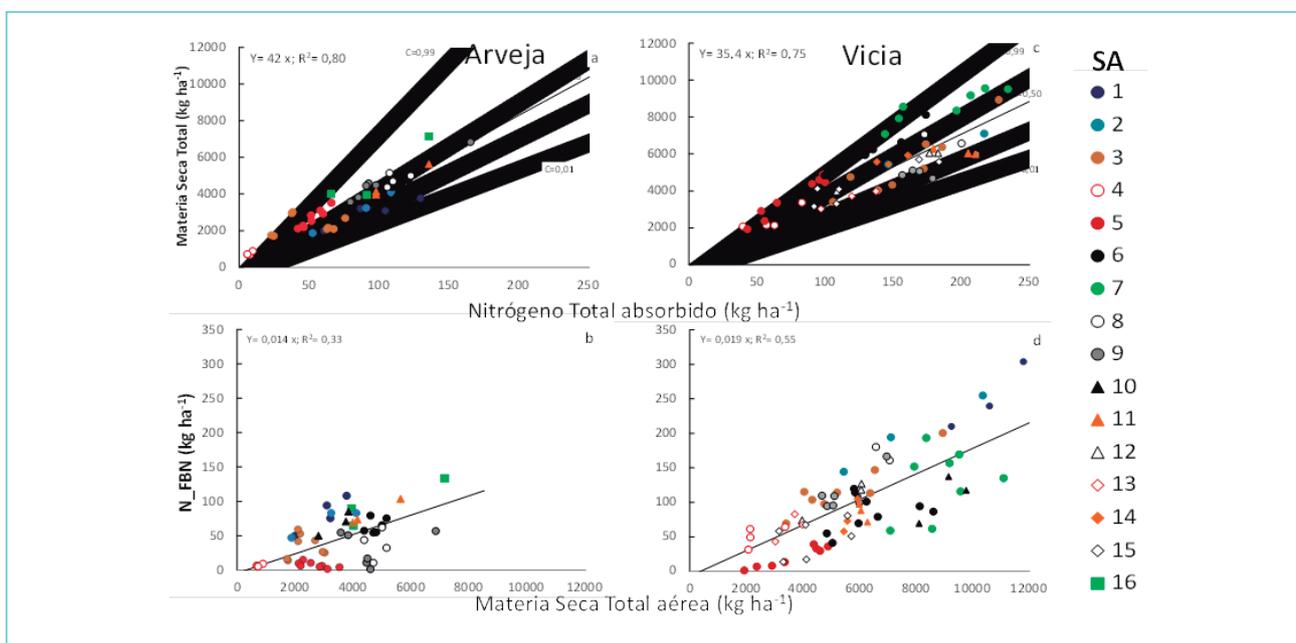


Figura 2: Relaciones entre la biomasa aérea y el nitrógeno total absorbido para el cultivo de arveja (a) y vicia (c) y entre el nitrógeno derivado de FBN y la biomasa aérea en arveja (b) y vicia (d). Las líneas punteadas fina representan los percentiles 0.01 y 0.99, las líneas punteadas gruesa los percentiles 0.25 y 0.75 y la línea entera el percentil 0,50. Cada símbolo representa un SA diferente (ver Tabla 1 para detalles).





Discusión

Estimaciones globales del aporte de N derivado de la FBN están alrededor de 20-22 millones de toneladas, (2.95 Tg N de leguminosas forrajeras y 18.5 Tg N de leguminosas oleaginosas; Herridge et al., 2008), de las cuales se exportan alrededor de 17 millones de toneladas N año⁻¹ en los granos (Peoples et al., 2009). Esto sugiere, al menos a nivel global, una contribución neta relativamente pequeña de ca. 23% a través de FBN a los sistemas. Estos autores enfatizan la necesidad de tener información local de las diferentes leguminosas en cada región debido a diferentes interacciones entre la fijación biológica y el suelo-planta-cultivo gestión en cada región particular. Las estimaciones de FBN en el presente estudio son las primeras cifras de % Ndfa en arveja y vicia en la región pampeana de Argentina.

En el presente estudio, la vicia y la arveja presentaron un % Ndfa similar (ca. 59 %). En la misma región se observó una contribución relativa similar de la FBN en soja (Collino et al., 2015) y alfalfa (Racca et al., 2013). Otros estudios de FBN en arveja mostraron contribuciones relativas entre 20 y 75 % (Peoples et al., 2009; McCauley et al., 2012), dependiendo de las condiciones ambientales. En vicia, informes anteriores han mostrado contribuciones del 46 al 79 % (Papastylianou y Danso, 1991; Rochester y Peoples, 2005; Almeida Acosta et al., 2011; Pinto, 2018), y en términos absolutos, la FBN osciló entre 60 y 115 kg N ha⁻¹. En el presente estudio, la vicia y la arveja incorporaron ca. 94 y 45 kg N ha⁻¹ de FBN, respectivamente. En el primer caso, esta cantidad representa un ingreso neto de N al sistema si se usa como CC ya que no hay exportación de grano en la cosecha. Sin embargo, en la arveja, el saldo del balance parcial de N, el cual indica la contribución neta de N al sistema a través de FBN, mostró un valor medio ligeramente positivo (ca. 5 kg N ha⁻¹) y un RIC entre -20 a 13 kg N ha⁻¹. Entonces, bajo estas condiciones, la arveja sería un contribuyente neutral al sistema de N de FBN. Sin embargo, como Peoples et al. (2009) describieron en su trabajo, gran parte de la N₂ fijado por los cultivos comerciales de legumbres es generalmente sustraído con la cosecha de semillas con alto contenido de proteínas y, por lo tanto, la contribución residual neta del N fijado a los suelos agrícolas después de la cosecha puede ser relativamente pequeña. En este sentido, la mayor demanda de N de semillas de soja (en com-

paración con otros cultivos de leguminosas de grano) implicaron un balance parcial de nitrógeno (BPN) más negativo y solo se evidenciaron BPN positivos en pocas ocasiones y solamente cuando la FBN fue superior al 70% (Ciampitti y Salvagiotti, 2018). Sin embargo, estas estimaciones no tuvieron en cuenta N aportado por las estructuras subterráneas (raíces y nódulos) las que podrían aumentar la contribución de N_FBN al sistema. Los estudios en leguminosas forrajeras han mostrado que el contenido de N en las raíces y en la rizodeposición pueden aumentar respectivamente un 14 y 10 % la contribución de N_FBN (Walley et al., 2007). Por otro lado, Rochester y Peoples (2005) sugirieron que el aporte de N proveniente del sistema radical y de los nódulos es del 40 %.

Como anteriormente se ha informado en varias leguminosas, el N derivado de la FBN estuvo estrechamente relacionado con la biomasa aérea. En leguminosas de ciclos invernales y estivales, Herridge et al. (2008) determinaron 15–25 kg de N_FBN por Mg de biomasa aérea, un rango que incluye lo observado en el presente estudio (16 y 17 kg de N_FBN por Mg de biomasa en vicia y arveja, respectivamente). Este requerimiento es inferior al observado en leguminosas de ciclo estival como la soja, en la cual se registraron 18.5 kg de N_FBN para producir 1 Mg de biomasa aérea a madurez fisiológica (Collino et al., 2015) o el de la alfalfa con requirió de 23 kg de N_FBN por Mg de biomasa (Racca et al., 2001). Cuando se consideran las estructuras subterráneas de las plantas Peoples et al. (2009) estimaron en para varias leguminosas un requerimiento de 30–40 kg de N_FBN por Mg de biomasa.

Estos resultados muestran que al momento de decidir la inclusión de una leguminosa en la rotación, ya sea como cultivo de renta (arveja) o CC (vicia), la inoculación de las mismas tiene un fuerte impacto en el aporte de N al sistema.

Conclusiones

La contribución de N derivado de FBN en vicia de CC y arveja para grano en distintas condiciones edafoclimáticas de la región pampeana fue en promedio de 60 %, sin embargo, esta proporción no fue suficiente para contrarrestar la exportación de N con grano en la arveja dado que el balance parcial de N tuvo un saldo cercano a 0 (cero).



Bibliografía:

- Almeida Acosta, J.A., Amado, T.J.C., Neergaard, A.D., Vinther, M., Silva, L.S., Nicoloso, R.S., 2011. Effect of 15N-labeled hairy vetch and nitrogen fertilization on maize nutrition and yield under no-tillage. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35, 1337–1345.
- Alvarez, R., Steinbach, H.S., De Paepe, J.L., 2017. Cover crop effects on soils and subsequent crops in the pampas: a meta-analysis. *Soil Tillage Res.* 170, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.03.005>.
- Battany, M.C., Grismer, M.E., 2000. Rainfall runoff and erosion in Napa Valley vineyards: effects of slope, cover and surface roughness. *Hydrol. Process.* 14, 1289–1304. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1085\(200005\)14:7%3C1289::AIDHYP43%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1085(200005)14:7%3C1289::AIDHYP43%3E3.0.CO;2-R).
- Blanco-Canqui, H., 2012. 12 A.D. "Crop residue removal for bioenergy reduces soil carbon pools: how can we offset carbon losses?". *Bioenergy Res.* 6, 358–371. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9221-3>.
- Blanco-Canqui, H., Shaver, T.M., Lindquist, J.L., Shapiro, C.A., Elmore, R.W., Francis, C.A., Hergert, G.W., 2015. Cover crops and ecosystem services: insights from studies in temperate soils. *Biology* 107, 2449–2474. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0086>.
- Bray, R.H., Kurtz, L.T., 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59, 39–45. <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>.
- Bremner, J.M., 1965. Inorganic forms of nitrogen. In: Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. ASA, Madison-Wisconsin-USA.
- Büchi, L., Gebhard, C.A., Liebisch, F., Sinaj, S., Ramseier, H., Charles, R.I., 2015. Accumulation of biologically fixed nitrogen by legumes cultivated as cover crops in Switzerland. *Plant Soil* 393, 163–175. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2476-7>.
- Cade, B.S., Noon, B.R., 2003. A gentle introduction to quantile regression for ecologists. *Front. Ecol. Environ.* 1, 412–420. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0412:AGITQR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0412:AGITQR]2.0.CO;2).
- Cade, B.S., Richard, J., 2005. User manual for blossom statistical software. *Rev. Reprint* 128 (2001). <https://doi.org/10.3133/96217>. Reston, VA. (2005)
- Caviglia, O.P., Andrade, F., 2010. Sustainable Intensification of Agriculture in the Argentinean Pampas: Capture and Use Efficiency of Environmental Resources. In: Di Benedetto, Adalberto (Ed.), *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, pp. 1–8.
- Ciampitti, I.A., Salvagiotti, F., 2018. New insights into soybean biological nitrogen fixation. *Am. Soc. Agron.* 110, 1185–1196. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.06.0348>
- Collino, D.J., Salvagiotti, F., Peticari, A., Piccinetti, C., Ovando, G., Urquiaga, S., Racca, R.W., 2015. Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. *Plant Soil* 392, 239–252. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2459-8>.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>.
- Högborg, P., 1997. Tansley Review No. 95 15N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytol.* 137, 179–203. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x>.
- Koenker, R., Hallock, K.F., 2001. Quantile regression. *J. Econ. Perspect.* 15, 143–156.
- Laguerre, G., Depret, G., Bourion, M., Duc, G., 2007. *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytol.* 176, 680–690.
- Littell, R., Milliken, R., Stroup, W., Wolfinger, R., 1996. *SAS System for Mixed Models*. SAS Institute, North Caroline.



- McCauley, A.M., Jones, C.A., Miller, P.R., Burgess, M.H., Zabinski, C.A., 2012. Nitrogen fixation by pea and lentil green manures in a semi-arid agroecoregion: effect of planting and termination timing. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 92 (3), 305–314. <https://doi.org/10.1007/s10705-012-9491-3>.
- Möller, K., Stinner, W., Leithold, G., 2008. Growth, composition, biological N₂ fixation and nutrient uptake of a leguminous cover crop mixture and the effect of their removal on field nitrogen balances and nitrate leaching risk. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 82, 233–249. <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9182-2>.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1973. Determination of total nitrogen in plant Material1. *Am. Soc. Agron.* 65, 109–112.
- Omae, H., Nagumo, F., 2016. Effects of oat (*Avena sativa*) and hairy vetch (*Vicia villosa*) cover crops on nitrate leaching, soil water, and maize yield in Subtropical Islands in Japan. *J. Agric. Sci.* 8, 44.
- Orr, D.B., Landis, D.A., Mutch, D.R., Manley, G.V., Stuby, S.A., King, R.L., 1997. Ground cover influence on microclimate and *Trichogramma* (Hymenoptera: trichogrammatidae) augmentation in seed corn production. *Environ. Entomol.* 26, 433–438.
- Papastylianou, I., Danso, S.K.A., 1991. Nitrogen fixation and transfer in vetch and vetch- oats mixtures. *Soil Biol. Biochem.* 23, 447–452.
- Peoples, M.B., Baldock, J.A., 2001. Nitrogen dynamics of pastures: nitrogen fixation inputs, the impact of legumes on soil nitrogen fertility, and the contributions of fixed nitrogen to Australian farming systems. *Aust. J. Exp. Agric.* 41, 327–346. <https://doi.org/10.1071/EA99139>.
- Peoples, M.B., Brockwell, J., Herridge, D.F., Rochester, I.J., Alves, B.J.R., Urquiaga, S., Boddey, R.M., Dakora, F.D., Bhattarai, S., Maskey, S.L., 2009. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48, 1–17.
- Pinto, P., 2018. Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno y la producción de raíces en distintos cultivos de servicios y sus efectos sobre las reservas de C y N orgánico del suelo. Doctor FAUBA.
- Preissel, S., Recklingb, M., Schläfkea, N., Zandera, P., 2015. Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: a review. *Field Crops Res.* 175, 64–79.
- Pullaro, T.C., Marino, P.C., Jackson, D.M., Harrison, H.F., Keinath, A.P., 2006. Effects of killed cover crop mulch on weeds, weed seeds, and herbivores. *Agric. Ecosyst. Environ.* 115, 97–104.
- Quemada, M., Cabrera, M.L., 1995. Carbon and nitrogen mineralized from leaves and stems of four cover crops. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 471–477. <https://doi.org/10.2136/sssaj1995.03615995005900020029x>.
- Racca, R., Collino, D., Dardanelli, J., Basigalup, D.H., González, N.S., Brenzoni, E., Hein, N.E., Balzarini, M.G., 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA, pp. 36.
- Racca, R., Odorizzi, A., Arolfo, V., Balzarini, M., Basigalup, D., Brenzoni, E., Campillo, R., Cangiano, C., Collino, D., Correa, N., Dardanelli, J., De Luca, M., Gonzalez, N., Grassano, A., Labandera, C., Lagares, A., Peticari, A., Ronchi, A., Rosas, S., 2013. Contribución a una producción sostenible de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos en Argentina, Chile y Uruguay. Ediciones INTA, Buenos Aires, pp. 43.
- Reed, J.F., Cummings, R.W., 1945. Soil reaction-glass electrode and colorimetric methods for determining ph values of soils. *Soil Sci.* 1, 97–105.
- Reicosky, D.C., Forcella, F., 1998. Cover crop and soil quality interactions in agroecosystems. *J. Soil Water Conserv.* 53, 224–229.
- Restovich, S.B., Andriulo, A.E., Améndola, C., 2011. Introducción de cultivos de cobertura en la rotación soja-maíz: efecto sobre algunas propiedades del suelo. *Ciencia del suelo* 29, 61–73.
- Rochester, I., Peoples, M., 2005. Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: inputs of fixed N, N fertilizer savings and cotton productivity. *Plant Soil* 271, 251–264.
- Shearer, G., Kohl, D.H., 1986. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Funct. Plant Biol.* 13, 699–756.
- Soil Survey Staff, 2014. Keys to soil taxonomy. *Soil Conserv. Serv.* 12, 410. <https://doi.org/10.1109/TIP.2005.854494>.



- Villamil, M.B., Bollero, G.A., Darmody, R.G., Simmons, F.W., Bullock, D.G., 2006. No-till corn/soybean systems including winter cover crops. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 1936–1944.
- Wagger, M.G., 1989. Time of desiccation effects on plant composition and subsequent nitrogen release from several winter annual cover crops. *Agron. J.* 81, 236–241.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29–37.
- Walley, F.L., Clayton, G.W., Miller, P.R., Carr, P.M., Lafond, G.P., 2007. Nitrogen economy of pulse crop production in the Northern Great Plains. *Agron. J.* 99, 1710–1718.

