



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**“DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN SECUENCIAS CON
DIFERENTE PARTICIPACIÓN DE SOJA Y LEGUMINOSAS DE
INVIERNO. LA CONTRIBUCIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA
DE NITRÓGENO EN ESTRUCTURAS SUBSUPERFICIALES”**

ING. AGR. ESTEBAN KEHOE

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: ING. AG. (PHD) FERNANDO SALVAGIOTTI

CO-DIRECTOR: ING. AG. (PHD) GERARDO RUBIO

AÑO 2025

“DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN SECUENCIAS CON DIFERENTE PARTICIPACIÓN DE SOJA Y LEGUMINOSAS DE INVIERNO. LA CONTRIBUCIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN ESTRUCTURAS SUBSUPERFICIALES”

Esteban Kehoe

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la EEA INTA Oliveros, durante el período comprendido entre junio 2016 hasta enero 2021, bajo la dirección del Ing. Agr. (PhD.) Fernando Salvagiotti.

Nombre y firma del Doctorando

Nombre y firma del Director

Nombre y firma del Co - Director

Defendida:de 2025

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las instituciones CONICET, INTA y Facultad de Ciencias Agrarias, por su misión, iniciativa y promoción de generar avances en la investigación agropecuaria. Agradezco a estas instituciones por permitirme ser parte de ellas y darme la oportunidad de dejar mi pequeño aporte en una comunidad tan grande.

Muchas gracias a todo el personal de posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, que me atendió y asesoró en cada una de las reiteradas consultas.

Agradezco a todo el personal de la EEA INTA Oliveros, por el apoyo, compañía y enseñanzas. Por las oportunidades que me dieron, los momentos y experiencias compartidas y la confianza que depositaron.

Agradezco a la Ing. Agr. Amalia Manlla, porque mis primeras pasantías como estudiante de agronomía, y la experiencia desarrollada con ella fueron un grato acercamiento a la investigación e institución, y el punto de partida para el camino de ésta tesis

Agradezco a todo el personal de apoyo de la EEA INTA Oliveros por su colaboración, y principalmente a Diego Uliassi y Leonardo Martarello, que siempre colaboraron con el laborioso trabajo y metodología elegida del muestreo de raíces.

Agradezco a la Ing. Agr. Silvina Bacigaluppo e Ing. Agr. Juan Enrico, que como coordinadores de los ensayos de larga duración estuvieron siempre dispuestos ante las necesidades de trabajos en los mismos, y compartieron los valiosos resultados para esta publicación.

Gracias al grupo de becarios Micaela Biassoni, Nicolas Sanmarti y Damianos Damianidis, porque durante varios años no fue un grupo de trabajo sino un grupo de amigos con quienes disfrute mucho de las actividades realizadas de capacitación, investigación y extensión. El grupo de catarsis y autoayuda, de incentivo y fortalecimiento.

Gracias al director de tesis, por estar siempre dispuesto a que lo interrumpamos y listo para las consultas, por acompañarnos siempre a la par en todos los eventos de intercambio y exposición. Por ser un director dispuesto a compartir mucho más que solo momentos académicos.

DEDICATORIAS

A mi familia, que me apoyo y siempre me siguió en mis avances.

A Cande, que siempre me dio ánimos de seguir y me acompañó en todo este camino.

Y sobre todo a mis hijos. A Juli... por haberle robado un poco de nuestro mayor tesoro, que es nuestro tiempo compartido. A Lina, que desde la panza me impulso a terminar antes de su llegada, para estar más disponible para ella.

Se los dedico hijos, y espero enseñarles con este ejemplo los resultados que se logran con un gran esfuerzo y mucha voluntad.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS.

En revistas con referato:

- Kehoe, E., Rubio, G. & Salvagiotti, F. Contribution of different sources and origins of nitrogen in above- and below-ground structures to the partial nitrogen balance in soybean. *Plant Soil* 477, 405–422 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05418-0>
- Kehoe, E., Rubio, G., & Salvagiotti, F. (2024). Biological nitrogen fixation in field pea and vetch: Contribution from above and belowground structures to the partial nitrogen balance. *Field Crops Research*, 316, 109514. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2024.109514>

Comunicaciones y presentaciones a Congresos

- Kehoe, E. y Salvagiotti, F. “Comparación de metodologías en la determinación de biomasa de raíces”. XXVIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. ISBN 978-987-48396-7-1. Buenos Aires, 2022.
- Kehoe, E.; Bacigaluppo, S.; Enrico, J. M.; Salvagiotti, F. “cambios en el carbono organico del suelo por Intensificación de rotaciones”. XXVIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. ISBN 978-987-48396-7-1. Buenos Aires, 2022.
- Kehoe, E; Enrico, J.M.; Salvagiotti, F. “Balance de nitrógeno a escala de sistema en secuencias con distinta participación de leguminosas”. XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, ISBN 978-987 46870-3-6. Corrientes, 2020.
- Biassoni, M. Micaela; Agosti, M. B.; Kehoe, E.; Gutiérrez Boem, Flavio H.; Salvagiotti, F. “Indicadores de disponibilidad de nitrógeno (N) en secuencias cultivos de invierno- maíz tardío-trigo”. XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, ISBN 978-987 46870-3-6. Corrientes, 2020.
- Kehoe, E; Rubio, G y Salvagiotti, F. “Contribución de las raíces y la fijación biológica al balance de Nitrógeno en soja”. XXVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, ISBN 978-987 46870-0-5. San Miguel de Tucumán, 2018.

Presentaciones orales:

- Kehoe, E. “El aporte de las raíces a los balances de N en vicia”. 4° Simposio de cultivos de cobertura. EEA INTA Marco Juárez, 7 de septiembre del 2023.

- Kehoe, E. "Contribución de las estructuras sub-superficiales y la fijación biológica de nitrógeno en soja a los balances parciales de N en el sistema". ACSoja, 21 de septiembre del 2021. (Virtual)
- Kehoe, E; Rubio, G y Salvagiotti, F. "Contribución de las raíces y la fijación biológica al balance de Nitrógeno en soja". 7° Congreso de la Soja del MERCOSUR, MERCOSOJA 2019, ACSOJA, Bolsa de Comercio de Rosario, 4 y 5 de septiembre.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	14
1.1. INTRODUCCIÓN	15
1.2. LA CONTRIBUCIÓN DE LA FBN EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA EN LA REGIÓN PAMPEANA.	16
1.3. IMPORTANCIA DE LAS RAÍCES PARA LA ESTIMACIÓN CORRECTA DEL BALANCE DE N....	18
1.4 OBJETIVO GENERAL:.....	19
1.5 ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	19
CAPÍTULO 2	21
2.1 INTRODUCCIÓN	22
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.2.1 Lugar y diseño del experimento	24
2.2.2 Muestreo de plantas	25
2.2.3 Absorción de nitrógeno y fijación biológica del nitrógeno	26
2.2.4 Fuentes de nitrógeno para las semillas.....	27
2.2.5 Análisis de datos.....	28
2.3 RESULTADOS	29
2.3.1 Condiciones meteorológicas	29
2.3.2 Rendimiento, producción de biomasa e índice de cosecha	30
2.3.3 Absorción total de N.....	33
2.3.4 Fijación biológica del N.....	37
2.3.5 Ganancia y removilización aparente de N durante el periodo de llenado de semillas	37
2.3.6 Balance parcial de N	40
2.4 DISCUSIÓN.....	41
2.5 CONCLUSIONES	46
CAPÍTULO 3	48
3.1 INTRODUCCIÓN	49
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.2.1 Lugar y diseño del experimento	52
3.2.2 Muestreo de plantas	53
3.2.3 Absorción de nitrógeno y fijación biológica del nitrógeno	54
3.2.4 Análisis de datos.....	55
3.3 RESULTADOS	56
3.3.1 Condiciones meteorológicas	56
3.3.2 Arveja	57

3.3.3 Vicia	61
3.3.4 Balance parcial de N de arveja y vicia	66
3.4 DISCUSIÓN.....	71
3.5. CONCLUSIONES	77
CAPÍTULO 4	78
4.1 INTRODUCCIÓN	79
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
4.2.1 Descripción de rotaciones.....	83
4.2.2 Determinaciones de biomasa en los cultivos	85
4.2.3 Mediciones y determinaciones de suelo.....	88
4.2.4 Análisis de datos.....	89
4.3 RESULTADOS	90
4.3.1 Condiciones climáticas.	90
4.3.2 Ensayo de larga duración 1 (ELD1)	91
4.3.3 Ensayo de larga duración 2 (ELD2)	106
4.4 DISCUSION.....	118
4.5. CONCLUSIÓN	128
CAPÍTULO 5	129
5.1 Conclusiones.....	130
5.2 Futuras líneas de trabajo:.....	132
bibliografía	134
ANEXOS	145

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

C	Carbono
N	Nitrógeno
N₂	Nitrógeno atmosférico
FBN	Fijación biológica de N
%N_{dfa}	Porcentaje del N proveniente de la FBN
N-FBN	N proveniente de fijación biológica de nitrógeno
BS	Biomasa subsuperficial
BA	Biomasa aérea
Sem	Biomasa semilla
BT	Biomasa total
IC_{BA}	Índice de cosecha de biomasa aérea
IC_{BT}	Índice de cosecha de biomasa total
N-BS	N absorbido en biomasa subsuperficial
N-BA_{Veg}	N absorbido en biomasa aérea vegetativa
Sem N	Nitrógeno de semilla
N-BT	Nitrógeno absorbido en biomasa total incluyendo raíces y nódulos
ICN	Índice de cosecha de nitrógeno
ICN_{BA}	Índice de cosecha de nitrógeno de biomasa aérea
ICN_{BT}	Índice de cosecha de nitrógeno de biomasa total
N_{FBN}BS	Nitrógeno proveniente de fijación biológica en biomasa subsuperficial
N_{FBN}BA_{Veg}	Nitrógeno proveniente de fijación biológica en biomasa aérea vegetativa
Sem N_{FBN}	Nitrógeno proveniente de fijación biológica en semilla
N_{FBN}BT	Nitrógeno proveniente de fijación biológica en biomasa total
NRemov	Nitrógeno removilizado
Suelo_{Remov}	Nitrógeno del suelo removilizado
N-FBN_{Remov}	Nitrógeno proveniente de fijación biológica removilizado
N-Tot Remov	Nitrógeno total removilizado
BP_{BA}	Balance parcial de N de biomasa aérea
BP_{TB}	Balance parcial de N de biomasa total
A	Años
GM	Grupo de madurez
CH	Condiciones hídricas

FS	Fechas de siembra
CC	Cultivos de cobertura
ELD1	Ensayo de larga duración 1
ELD2	Ensayo de larga duración 2
Arv	Arveja
Trg	Trigo
Vic	Vicia
BB	Barbecho sin cultivo
Sj	Soja
Mz	Maíz
II	Índice de intensificación
%N	Concentración de nitrógeno
Cveg	Carbono en biomasa vegetativa incluyendo raíces
C grano	Carbono en grano
Nveg	Nitrógeno en biomasa vegetativa incluyendo raíces
Ngrano	Nitrógeno en grano
ICN_{sist}	Índice de cosecha de nitrógeno del sistema
EG	Equivalente de glucosa
EUN_{sist}	Eficiencia del uso de nitrógeno del sistema
COS	Carbono orgánico del suelo
COT	Carbono orgánico total
COP	Carbono orgánico particulado
Ntot	Nitrógeno total del suelo
NOP	Nitrógeno orgánico particulado
Nan	Nitrógeno incubado en anaerobiosis
me	Masa equivalente
Cult	Cultivares

RESUMEN:

DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN SECUENCIAS CON DIFERENTE PARTICIPACIÓN DE SOJA Y LEGUMINOSAS DE INVIERNO. LA CONTRIBUCIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN ESTRUCTURAS SUBSUPERFICIALES.

En las últimas décadas, la región pampeana de Argentina ha experimentado una continua pérdida de fertilidad del suelo, evidenciada principalmente por la reducción de los niveles de carbono (C) y nitrógeno (N), nutrientes vitales para la producción de cultivos. La sostenibilidad de los niveles productivos de estos suelos es esencial para satisfacer la creciente demanda global de alimentos. Debido a esto, esta investigación aborda la necesidad de mantener o recuperar la fertilidad del suelo a través de prácticas agrícolas sostenibles que integren el manejo eficiente de los sistemas de cultivos, y del balance de nitrógeno en secuencias con incorporación de cultivos de cobertura.

El objetivo general de la tesis fue estudiar las dinámicas de entradas y salidas de nitrógeno en distintas secuencias de cultivos con distinto grado de intensificación mediante la inclusión de leguminosas o gramíneas durante períodos de barbechos, y evaluar el impacto de la fijación biológica de N (FBN) por la inclusión de soja y/o leguminosas de invierno en los contenidos de C y N en el suelo, y en los balances de N a nivel de sistema, teniendo en cuenta los aportes subsuperficiales.

Se realizaron experimentos para evaluar la absorción de nitrógeno y la FBN en diferentes cultivos, de soja, vicia y arveja, incluyendo determinaciones a campo de los aportes de estructuras subsuperficiales hasta 30 cm de profundidad. Además, se evaluaron los aportes acumulados de C y N en ensayos de larga duración, caracterizados por diferentes índices de intensificación.

Los resultados obtenidos demostraron que los aportes de biomasa subsuperficial de los cultivos evaluados son inferiores a los valores de referencia, representando la biomasa subsuperficial 10 y 5% de la biomasa total en madurez fisiológica de soja y arveja, y 13% en floración de vicia.

Por otro lado, la incorporación de vicia como cultivo de cobertura, mejora significativamente los balances de nitrógeno y carbono en el suelo. El cultivo de vicia fue el cultivo que aportó las mayores cantidades de N (hasta 160 kg N-FBN ha⁻¹), incluso en fechas de siembra tardías. En cambio, el cultivo de arveja para producción de granos, no aporta cantidades significativas de N, y no presenta diferencias significativas en el balance de nitrógeno en comparación con el trigo o la ausencia de cultivos invernales. La inclusión de trigo como cultivo de cobertura mejora los aportes de

carbono, pero no tiene un impacto significativo en el nitrógeno del suelo. Estos hallazgos destacan la importancia de elegir adecuadamente los cultivos al intensificar las rotaciones, para maximizar los beneficios en términos de fertilidad del suelo, demostrando además que es necesario mantener altos porcentajes de ocupación con leguminosas para lograr mayores aumentos del C del suelo. En rotaciones a base de soja, la inclusión de gramíneas como cultivos de cobertura no produjo mejoras en el C o N del suelo.

Este estudio destaca además la necesidad de considerar las estructuras subsuperficiales, como raíces y nódulos, para obtener estimaciones precisas de los balances de nutrientes. Estos componentes, a pesar de sus bajos aportes netos, pueden ser determinantes para cambiar el signo del balance de N, pasando de negativo a positivo en ciertos casos.

Se proporciona una base sólida para futuras prácticas y políticas agrícolas que busquen equilibrar la producción de alimentos con la conservación de los recursos del suelo. La tesis concluye que, a través de un manejo adecuada del nitrógeno, y la inclusión estratégica de cultivos de cobertura que aporten N en períodos de barbecho, es posible mantener y mejorar la fertilidad del suelo.

PALABRAS CLAVES: biomasa subsuperficial, fijación biológica de nitrógeno, balance de nitrógeno.

ABSTRACT:

NITROGEN DYNAMICS IN SEQUENCES WITH DIFFERENT PARTICIPATION OF SOYBEAN AND WINTER LEGUMES. THE CONTRIBUTION OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN BELOWGROUND STRUCTURES.

Over recent decades, the Pampas region of Argentina has experienced ongoing soil degradation, primarily evidenced by a reduction in soil carbon (C) and nitrogen (N) levels—vital nutrients for crop production. Sustaining soil productivity levels will be vital to meet the world's growing demand for food. This research focuses on maintaining or improving soil fertility through sustainable agricultural practices, particularly by the intensification of cropping sequences and nitrogen balance, enhanced by cover crops or cash crops sown during fallow period.

The thesis aimed to study nitrogen dynamics in crop sequences with legumes or grass in fallow periods, focusing on biological nitrogen fixation and its impact on soil C and N contents, especially belowground biomass. Experiments assessed nitrogen uptake and BNF in field crops like soybean, vetch, and pea up to 30 cm depth. The research also examined cumulative C and N inputs in long-term crop sequences with varying cropping intensity.

The findings revealed that belowground biomass contributions were lower than expected. Specifically, belowground biomass accounted for 10% and 5% of total biomass at the physiological maturity of soybean and pea, respectively, and 13% at full bloom of vetch.

Inclusion of vetch as a cover crop improved soil nitrogen and carbon balances. Vetch contributed the highest N levels (c.a. 160 kg N-BNF ha⁻¹), even in late sowing. Field pea sown as a cash crop, did not significantly enhance N levels or improve the nitrogen balance compared to wheat or the absence of winter crops. While wheat as a cover crop increased carbon inputs, it had no notable impact on soil nitrogen. These results highlight the importance of selecting appropriate crops to maximize soil fertility benefits and suggest that a high frequency of legumes is crucial for significant increases in soil C. The inclusion of wheat in soybean-based rotations did not enhance soil C or N.

The study emphasizes the importance of considering belowground structures, such as roots and nodules, to accurately estimate nutrient balances. Although their contributions are relatively low, they can significantly influence the overall nitrogen balance.

In conclusion, the research indicates that strategic nitrogen management and the inclusion of N-rich cover crops during fallow periods can effectively maintain and improve soil fertility in the Pampean region.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

El éxito de Argentina en la producción de granos fue posible gracias a la fertilidad física y química de sus suelos, produciéndose durante más de 60 años una gran extracción de nutrientes, que no fueron compensados mediante la fertilización (Koritschoner et al., 2023). En la región pampeana, la dosis de fertilización nitrogenada promedio de los principales cultivos en rotación es de 73 kg N ha⁻¹ en maíz (*Zea mays* L.), 60-100 kg N ha⁻¹ en trigo (*Triticum aestivum* L.), y sin fertilización nitrogenada en soja [*Glycine max* (L.) Merr] (Cafaro La Menza y Carciochi, 2023), habiéndose estimado pérdidas de nitrógeno (N) asociadas a las pérdidas de materia orgánica entre 20-30 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Díaz de Astarloa y Pengue, 2018; Koritschoner et al., 2023; Viglizzo et al., 2011) durante los últimos 60 años.

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza y es un nutriente esencial para los cultivos (Fageria, 2014). Interviene directamente en el proceso de fotosíntesis y la composición de proteínas estructurales, enzimas, aminoácidos, ácidos nucleicos y hormonas (Kumar et al., 2002), y es el nutriente más importante que limita el rendimiento de los cultivos a nivel mundial (Fageria et al., 2005).

El nitrógeno atmosférico no-reactivo (N₂) es el pool más importante de nitrógeno en la biósfera (ca. 79% del aire), acumulando 75000 Mg de N en el aire que se encuentra por encima de cada hectárea de suelo (Brady et al., 2008). Sin embargo, debido a la naturaleza de su composición, éste es un gas extremadamente inerte que solo puede ser aprovechado en la naturaleza por grupos específicos de bacterias libres, y simbióticas asociadas a leguminosas, que poseen el complejo enzimático nitrogenasa que específicamente puede romper la triple ligadura del N₂ (Dixon y Kahn, 2004), y en menor proporción a través de las tormentas eléctricas. Por lo tanto, la producción de los cultivos depende de los pequeños aportes del N fijado por microorganismos libres y N liberado por hongos micorrizicos, y en mayor proporción del N inorgánico (NO₃⁻, NH₄⁺) del suelo, mientras que en cultivos de leguminosas el N atmosférico fijado por asociaciones simbióticas representa un gran aporte adicional de N.

La reposición del N inorgánico del suelo depende en mayor medida de la materia orgánica del suelo, ya que ésta contiene aproximadamente un 5% de nitrógeno, siendo el pool más grande de N del suelo. Estas fracciones presentan una gran variabilidad en cada sistema de producción dependiendo las prácticas de manejo, y el balance resultante de las salidas de N (cosecha de grano, erosión, pérdidas gaseosas, y lixiviación), y las entradas de N al sistema (fertilizante, residuos orgánicos, fijación biológica de N y organismos fijadores libres) (Vitousek et al., 2009). La mayor fuente natural de aportes de N proviene de la fijación biológica de N (FBN), producto de la

asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios, que sostiene la contribución total de este nutriente en sistemas naturales (Vitousek et al., 2013). En agroecosistemas, la FBN de los cultivos leguminosos juegan un importante papel en la reposición de las reservas de N del suelo para los cultivos no fijadores de N.

La dinámica del N en el suelo a su vez depende del balance de carbono (C), ya que el ciclo del C y N son mutuamente dependientes entre sí. Esto se debe a que, el crecimiento de los cultivos puede verse limitado por la disponibilidad de N, afectando la cantidad y calidad de los residuos vegetales, traduciéndose en menores aportes de C en la biomasa de cultivos. Por lo tanto, la forma en que ocurre el enriquecimiento de N del suelo, podría influir sobre los flujos de C dentro del sistema de cultivos y hacia afuera del mismo, determinando si el aumento o pérdidas de los aportes de N conduce a un aumento o a una disminución del secuestro de C (Yue et al., 2016).

Los balances de N permiten estimar la magnitud de ganancias o pérdidas cuando se utilizan leguminosas en un sistema de producción, permitiendo además analizar la eficiencia en el uso de los fertilizantes o evaluar la sustentabilidad en el manejo del N en distintos agroecosistemas. La elaboración de estos balances de N requiere además una correcta estimación de los ingresos de este nutriente, especialmente aquellos provenientes de FBN (Boyer et al., 2004). A nivel global, Smil (1999) estimó que la FBN representa ca. 17% del total de las entradas de N de los sistemas bajo agricultura. En la misma escala de análisis, (Galloway et al., 2004) estimaron que ca. 65% del N inorgánico del suelo proviene de la FBN, y las plantas cultivadas representan ca. 20% del total de las entradas antrópicas de N. En consecuencia, el aporte de N derivado de FBN y su impacto en el balance de N dependerá de la presencia relativa de cultivos de grano, cultivos de cobertura y/o pasturas leguminosas en los distintos sistemas de producción.

1.2. LA CONTRIBUCIÓN DE LA FBN EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA EN LA REGIÓN PAMPEANA.

En los sistemas de producción agrícolas de Argentina, durante las últimas décadas, se generalizó la adopción de sistemas de monocultivo de soja, como consecuencia de los beneficios económicos y tecnológicos de la soja transgénica (Novelli et al., 2023). A causa de esto, se produjeron drásticas reducciones en la superficie cultivada con cereales, predominando sistemas de cultivos rotados en donde la soja tiene una participación importante en el tiempo de ocupación. Collino et al., (2015), y Ciampitti y Salvagiotti, (2018) informaron que la FBN en el cultivo de soja puede contribuir con ca. 50-60% del N total requerido por el cultivo. Teniendo en cuenta este

porcentaje, y dado que el cultivo de soja tiene un índice de cosecha de N de ca. 73% (Salvagiotti et al., 2008), no se esperaría un aporte neto de N en sistemas donde predomine este cultivo (Austin et al., 2006). Los balances de N en soja demuestran que la gran demanda de N del cultivo no puede ser satisfecha únicamente por la absorción de N proveniente de FBN y N del suelo, cumpliendo un rol fundamental en la demanda de N la removilización de éste nutriente de los órganos vegetativos hacia los granos (Ortez et al., 2019). Esta capacidad de removilización, determina además la cantidad de N remanente en residuos que representan los aportes de N, y dependiendo de la fuente del N vegetativo removilizado (FBN o N del suelo) incidirá en los balances de N de soja. Sin embargo, éstas estimaciones no incluyen el aporte y removilización de las estructuras subsuperficiales (raíces y nódulos) y las rizodeposiciones, que elevarían el aporte de la FBN (pudiendo contribuir con 4-40% del la FBN total, Gelfand y Philip Robertson, (2014), Unkovich y Pate, (2000)), reduciendo las estimaciones de pérdidas de N en el cultivo de soja.

Otra estrategia propuesta para reducir las pérdidas de nutrientes, causadas por la reducción de materia orgánica, lixiviación, erosión, volatilización, etc, es la implementación de la intensificación agrícola sustentable, implantando cultivos que crecen entre dos cultivos de grano, y reduciendo o eliminando los periodos de barbecho. Ésta intensificación sustentable propone además mejorar el uso de agua, radiación y nutrientes (Caviglia y Andrade, 2010). Entre estas alternativas de inclusión de cultivos se puede nombrar el uso de cultivos de cobertura (CC) como gramíneas de invierno (*i.e.* trigo, centeno, etc.) o leguminosas (*i.e.* vicia - *Vicia villosa* Roth). En el caso de cultivos de grano además del trigo o la cebada, existen alternativas como la arveja (*Pisum sativum* L.) o la lenteja. Cada uno de estos cultivos afectará de manera diferente la dinámica del N en el sistema, en especial si se incluyen leguminosas, dado su aporte de N a través de la FBN.

Cafaro La Menza y Carciochi, (2023) demostraron que en la región pampeana la Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca registró un aumento de 318% en la superficie implantada con CC de gramíneas, leguminosas o combinación de ambas, pasando de 110.000 a 350.000 ha entre 2019 y 2022. La elección de las especies a implantar variará en cada región geográfica según adaptabilidad de los cultivos, y según los objetivos específicos (cobertura para aporte de carbono al suelo, control de malezas, aporte de N, etc.). Sin embargo, la posibilidad de implementación de estos cultivos también depende en gran medida de los balances hídricos que condicionarán la productividad de los cultivos de grano siguiente en la rotación. Respecto a cultivos que contribuyan con N al sistema, existe un amplio consenso que la implantación de leguminosas como CC es la alternativa que más N aporta en una rotación (Cafaro La

Menza y Carciochi, 2023; Duval et al., 2016; Enrico et al., 2020), sin embargo, no existen trabajos en la región pampeana que hayan cuantificado el impacto de los diferentes cultivos de cobertura sobre la FBN, su aporte subsuperficial al balance de N, y su incidencia sobre la dinámica del N en el sistema.

1.3. IMPORTANCIA DE LAS RAÍCES PARA LA ESTIMACIÓN CORRECTA DEL BALANCE DE N.

El aporte de nutrientes de los cultivos al sistema de producción está directamente ligado a la cantidad y calidad de residuos que permanecen en el sistema luego de la cosecha y su posterior mineralización. Una de las variables comúnmente utilizadas para estimar las proporciones de estos aportes es el índice de cosecha. El mismo representa la proporción de grano en relación a la biomasa total, expresada como la producción de biomasa aérea. En general, los estudios de balances de nutrientes no consideran el aporte de raíces a dichos balances, debido a las dificultades y el tiempo que demandan estas evaluaciones de biomasa subsuperficial. Por ello, pocos estudios han abordado esta temática respecto determinaciones de biomasa subsuperficial en condiciones de campo. En su lugar, suelen utilizarse indicadores del papel relativo de las estructuras subsuperficiales basándose en mediciones de biomasa aérea, y en una proporción fija de biomasa subsuperficial, y contenido de N relativo al N de la biomasa aérea o total (Evans et al., 2001; Palmero et al., 2022; Walley et al., 2007). La mayor proporción de estos indicadores fueron obtenidos en condiciones de invernadero, que no imita completamente el crecimiento de las plantas y las raíces bajo las complejas interacciones suelo-planta que ocurren en condiciones de campo. O simplemente fueron determinados en sistemas productivos con condiciones contrastantes a los de la región pampeana. Por lo tanto, la literatura aún no proporciona una base sólida para predecir la contribución de biomasa y N de la biomasa subsuperficial de diferentes cultivos, y estimaciones más precisas de la contribución de la FBN al sistema requiere mediciones exactas de la biomasa y de la absorción de N en las estructuras subsuperficiales en condiciones de campo.

En consecuencia, el balance de residuos y biomasa debería incluir el aporte de las estructuras subsuperficiales, y la proporción del N que es aportado a través de la fijación biológica. Esta información es de alto impacto para analizar con mayor precisión los balances de N de los sistemas que incluyan leguminosas. Es sabido que el crecimiento y producción de los cultivos está directamente relacionado con la capacidad de captura de recursos del sistema (i.e. agua, nutrientes, radiación). Por lo tanto, las prácticas de manejo que se impongan en los cultivos (fecha de siembra, elección del

genotipo, etc.) modulará la captura de recursos produciendo diferencias en la producción de biomasa, tanto aérea como subsuperficial.

Frasier et al., (2019) demostraron que el tipo de suelo y el clima modela la capacidad de captura de nutrientes del suelo, siendo los aportes de las raíces más importante que los aportes de biomasa aérea para la captura de C del suelo. En concordancia con esto, Pinto et al., (2021) concluyeron que la selección de cultivos con la finalidad de aumentar la materia orgánica del suelo basándose únicamente en la biomasa aérea, es insuficiente. Destacando la importancia de otras cualidades de los cultivos, como la biomasa de raíces o la FBN, que proporcionarían mayores servicios claves de regulación y apoyo a los ecosistemas. Por lo tanto, es esperable que diferentes prácticas de manejo implementadas en leguminosas también afecten el crecimiento de las estructuras subsuperficiales y su aporte de C y N al suelo, sin embargo, los cambios en el contenido de estos nutrientes en el suelo son procesos naturalmente lentos y sólo pueden evaluarse en secuencias de cultivos a largo plazo. Muchos trabajos han evaluado el efecto de la inclusión de leguminosas a escala de cultivo y los aportes de N (Danga et al., 2009; Kumar y Goh, 1999), sin embargo, pocos estudios han realizado análisis de las entradas y salidas de N en el sistema a largo plazo, cuantificando los efectos de diferentes secuencias, asociadas a la dinámica del N y los aportes de estructuras subsuperficiales. Es por ello, que los experimentos de larga duración, con diferentes sistemas de rotación representan un enfoque del sistema en la investigación de la producción de cultivos, y permite reconocer los efectos de cambios lentos que son imposibles de detectar a corto plazo (Salvagiotti et al., 2017).

1.4 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la dinámica de entradas y salidas de nitrógeno en secuencias de cultivos con distinto grado de intensificación y evaluar el impacto de la fijación biológica de N por la inclusión de soja y/o leguminosas de invierno en los contenidos de C y N en el suelo y en los balances de N a nivel de sistema.

1.5 ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La tesis se organizó en cinco capítulos

En el primer capítulo se describe detalladamente la problemática a partir de la cual se plantean los trabajos de investigación, mostrando antecedentes en las

estimaciones de pérdidas de nitrógeno en suelos debido a los altos rendimientos que no son compensados con el manejo mas adecuado del nitrógeno (cultivos de cobertura o fertilización). Se detalla la necesidad e importancia de estimaciones de biomasa subsuperficial en condiciones de campo, para poder ajustar de forma mas precisa estos balances.

En el capítulo dos se detalla el trabajo de investigación de dos grupos de madurez de soja bajo condiciones hídricas contrastantes, donde se realizaron determinaciones de biomasa de las estructuras aéreas, raíces y nódulos. Además, se determinó la cantidad de N proveniente de FBN y suelo, el balance de N, y la removilización de N según diferentes fuentes (estructuras) y orígenes del N (FBN o N suelo).

En el capítulo tres, se cuantificó la biomasa aérea y subsuperficial de dos cultivares de arveja con estructura aérea contrastante, y diferentes fechas de siembra en un mismo año y una fecha de siembra en distintos años en vicia. Se realizaron determinaciones de N total y N de FBN en cada estructura para calcular el balance parcial de N.

En el capítulo cuatro, se cuantificó el efecto de diferentes secuencias de cultivo con diferente grado de ocupación del suelo, con gramíneas o leguminosas, sobre el balance de N, el aporte de la FBN al balance de N, y los cambios sobre el C y N del suelo. Para este trabajo se utilizaron dos ensayos de larga duración de la EEA INTA Oliveros que mantienen sistemas de rotaciones de cultivos por 9 y 6 años. Se estimaron los aportes de biomasa subsuperficial de todos los cultivos para evaluar la asociación de éstos con el balance parcial acumulado de N y el C y N del suelo.

En el capítulo cinco se describen las conclusiones generales y posibles futuras líneas de trabajo. Las distintas hipótesis planteadas serán respondidas en los distintos capítulos de esta tesis.

CAPÍTULO 2

Contribución de diferente fuentes y origen del nitrógeno al balance parcial de nitrógeno en soja.

Este capítulo fue publicado en: Kehoe, E., Rubio, G. & Salvagiotti, F. Contribution of different sources and origins of nitrogen in above- and below-ground structures to the partial nitrogen balance in soybean. *Plant Soil* 477, 405–422 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05418-0>

2.1 INTRODUCCIÓN

El nitrógeno cumple un rol imprescindible en la productividad de los cultivos y en la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. En este contexto, uno de los principales retos consiste en incrementar y mantener la disponibilidad de N en el suelo, mejorando la fertilidad del mismo, asegurando así altos rendimientos y, a la vez, minimizando los riesgos de pérdida y deterioro ambiental por las pérdidas de N al medio ambiente. (Giller y Cadisch, 1995; Ladha et al., 2020).

Con el objetivo de satisfacer la seguridad alimentaria, a escala global se ha observado un aumento del 35% en el consumo de fertilizantes nitrogenados en los últimos 20 años (FAOSTAT 2019). Esto generó aumentos del consumo de energía (principalmente combustibles fósiles), por la fabricación, transporte, almacenamiento y la aplicación de estos fertilizantes. (Erisman et al., 2008). A pesar de este aumento global, se registra una gran disparidad entre países y diferentes sistemas productivos en el uso de fertilizantes, generando contaminación por excesos de dosis, hasta agotamiento de nutrientes por subdosis de fertilizantes. Una alternativa económica y ecológicamente atractiva para incorporar N al agroecosistema es la inclusión de cultivos de leguminosas en la rotación. Sin embargo, un cultivo de leguminosas tiene una contribución positiva de N al agroecosistema sólo cuando los aportes de N a través de la fijación biológica de N (FBN) son mayores que las extracciones de N en el producto cosechado.

El cultivo de soja es la leguminosa más cultivada en todo el mundo, ocupando 123 millones de ha, produciendo 340 millones de Mg año⁻¹ y representa alrededor del c.a. 79% de la producción mundial de leguminosas de grano (FAOSTAT 2015-19). Estas cifras destacan la relevancia de la contribución neta de FBN al balance global de N en los cultivos de soja, ya que requieren c.a. 80 kg de N por Mg de rendimiento de semilla (Salvagiotti et al., 2008), de los cuales el 50-60% proviene de FBN (Ciampitti y Salvagiotti, 2018). En una extensa revisión Ciampitti y Salvagiotti, (2018) encontraron que cuando la proporción de FBN en el cultivo (%Ndfa) era inferior al 72%, solo un 15% de los casos estudiados mostraba un balance parcial de N positivo (diferencia entre el N aportado por la FBN y el exportado con las semillas). Sin embargo, en estos análisis se consideró el N derivado de la FBN tomando en cuenta las estructuras aéreas del cultivo, sin incluir las estructuras subsuperficiales (raíces y nódulos). Por lo tanto, es esperable una mayor contribución real de FBN si se consideran estas estructuras a lo previamente reportado por estos autores. La mayor parte de los estudios que han cuantificado la FBN incluyendo las estructuras subsuperficiales se han realizado principalmente en condiciones de invernadero (Bacanamwo y Purcell, 1999; Cassman

et al., 1980; Hoogenboom et al., 1987; Kirda et al., 1989; Manavalan et al., 2010; Suematsu et al., 2017). Sin embargo, este enfoque no imita el crecimiento de las plantas y las raíces bajo las complejas interacciones suelo-planta que ocurren en condiciones de campo. En condiciones de campo, Rochester et al., (1998) estimaron que el 39 y 24 % del N total del cultivo al inicio del llenado de granos y en madurez fisiológica procedía de componentes subsuperficiales, cuantificando la cantidad de ^{15}N en el suelo por medio de nutrición foliar con solución de urea enriquecida con ^{15}N . Por otra parte, Gelfand y Philip Robertson, (2014) encontraron en madurez fisiológica que solo el 3% del N total absorbido por la soja estaba localizada en raíces y nódulos, proviniendo el 91% de la FBN. Estas evidencias contrastantes muestran que la literatura aún no proporciona una base sólida para predecir la contribución de N de la biomasa subsuperficial en la soja, y que las diferencias se verán también reflejadas por diferentes condiciones de suelo y clima que afectarán la distribución del N dentro de la planta (Herridge et al., 2008).

Además de la FBN, el balance parcial de N depende de cuánto N se acumula y finalmente se exporta en las semillas. En la soja, como en la mayoría de los cultivos de grano, las semillas son el principal destino de N, ya sea de la FBN o tomado del suelo durante el periodo de llenado de granos (es decir, la ganancia actual de N), o removilizado desde las estructuras vegetativas. La cantidad y proporción de N removilizado a las semillas depende del genotipo (Kumudini et al., 2002; Masclaux-Daubresse et al., 2008; Zeiher et al., 1982) y de las condiciones ambientales durante el periodo de llenado (Gaspar et al., 2017; Muchow et al., 1993). En cultivos de soja de alto rendimiento, Salvagiotti et al., (2009) determinaron que la removilización aparente de N representó entre 35 y 42% del N de la semilla, mientras que Ortez et al., (2019) determinaron una proporción mayor (c.a. 59%). Santachiara et al., (2017) demostraron que el N de la semilla derivado de FBN fue mayor que el N derivado del suelo. Sin embargo, no existen antecedentes de estudios con soja en condiciones de campo que hayan cuantificado simultáneamente la contribución de las estructuras subsuperficiales a la removilización de N hacia las semillas y el origen de esta fuente (N del suelo y N de FBN).

En el presente capítulo se pondrán a prueba las siguientes hipótesis

Hipótesis 2.1 (asociada al **objetivo 2.1**): La inclusión del N subsuperficial derivado de FBN cambia el balance parcial de N de la soja de negativo a positivo.

Hipótesis 2.2 (asociada al **objetivo 2.2**): Independientemente del grupo de madurez y las condiciones hídricas del cultivo, la mayor parte del N de las semillas proviene de FBN, más que del N del suelo.

Hipótesis 2.3 (asociada al **objetivo 2.3**): La proporción de N del suelo y N-FBN removilizado desde las estructuras aéreas y subsuperficiales a las semillas bajo diferentes condiciones hídricas es similar.

Los objetivos de este capítulo son:

Objetivo 2.1. Estimar la contribución de la FBN de las estructuras subsuperficiales al balance parcial de N de la soja

Objetivo 2.2. Cuantificar la proporción relativa de N del suelo y FBN en las semillas

Objetivo 2.3. Estimar la proporción relativa de N del suelo y N-FBN que es removilizado desde las estructuras aéreas y subsuperficiales a las semillas.

El enfoque experimental consistió en un estudio de campo de dos años (2016/2018) que incluyó dos genotipos de soja pertenecientes a diferentes grupos de madurez y dos condiciones hídricas (secano y riego).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Lugar y diseño del experimento

Se realizaron dos experimentos en condiciones de campo durante las campañas agrícolas 2016/17 y 2017/18 en la Estación Experimental INTA Oliveros, Santa Fe, Argentina (32°33'S, 60°51'W). El suelo fue un Argiudol Típico, de textura franco limosa, perteneciente a la serie Maciel, representativo de la región pampeana norte (Rubio et al., 2019). El horizonte superior presenta 30, 750 y 220 g kg⁻¹, de arena, limo y arcilla, respectivamente (Mosconi et al., 1985). El carbono orgánico de la capa superior del suelo (0- 20 cm) (Walkley & Black), el fósforo extractable (P-Bray-1, Bray y Kurtz, 1945)), y el pH del suelo fueron de 12,5 g C kg⁻¹, 12,2 mg P kg⁻¹, y 6,3, respectivamente.

Los tratamientos consistieron en la combinación de dos genotipos pertenecientes al grupo de madurez (GM) IV (Sy4x1) y V (DM53i53 IPRO) y dos condiciones hídricas (CH): riego y secano. Las semillas se inocularon con cepas comerciales de *Bradyrhizobium japonicum* (E109, 2,5 mL kg⁻¹ semilla). Las fechas de siembra fueron el 7 de noviembre en 2016 y el 8 de noviembre en 2017, a una densidad de siembra de 31 plantas m⁻² en ambos años, con 80 kg ha⁻¹ de superfosfato simple (8 kg P ha⁻¹, y 9,6 kg S ha⁻¹) aplicados junto a la semilla. Los cultivos previos fueron trigo como cultivo de cobertura en 2016 y maíz en 2017. Los tratamientos se arreglaron en un diseño de bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones. Cada parcela tenía 10 surcos de ancho (0,52 m de separación entre surcos) y 20 m de largo. Los

tratamientos de riego se realizaron con un sistema de riego por goteo. Las malezas, enfermedades y plagas se controlaron químicamente siempre que fue necesario durante la temporada siguiendo las prácticas agronómicas locales.

2.2.2 Muestreo de plantas

El muestreo de biomasa subsuperficial y superficial se llevó a cabo en los estadios fenológicos R₂, R₅, y R₇ (Fehr y Caviness, 1977). En cada unidad experimental se cuantificó la biomasa de raíces y nódulos (en adelante biomasa subsuperficial) en bloques de suelo sin disturbar de 0,52 m de ancho (centrado en el surco), 35 cm de largo y 30 cm de profundidad tomados en cada unidad experimental. Bationo et al., (2007) sugieren cuantificar los cambios de carbono y nutrientes hasta esta profundidad dado que los efectos de las practicas antrópicas son más pronunciados hasta 30 cm de profundidad, sin generar cambios o afectar significativamente a las capas más profundas del suelo. Varios estudios han demostrado que las raíces pueden estar presentes hasta 1,8 - 2 m (Dardanelli et al., 1997; Ordóñez et al., 2018) , sin embargo, pocos estudios han cuantificado la biomasa hasta éstas profundidades, lo cual es relevante para estimar las reservas de carbono y nutrientes. Fan et al., (2016) informaron que el 50% de la biomasa radical de soja puede encontrarse en los 0,11 m superiores y el 68% en los 30 cm superiores del suelo. Entonces, teniendo en cuenta estas estimaciones, se extrapoló los resultados de 0-30 cm en raíces a todo el sistema radical. Se consideró que la biomasa nodular era insignificante por debajo de 30 cm (Grubinger et al., 1982). Las estructuras subsuperficiales se separaron de la tierra del suelo mediante un suave lavado a mano con un flujo constante de agua. En cada bloque de suelo muestreado, todas las raíces y nódulos se obtuvieron colando agua en exceso en una malla de 2 mm para recuperar restos finos de raíces desprendidas. En todos los momentos de muestreo, las estructuras subsuperficiales se separaron en raíces y nódulos, y las estructuras aéreas en hojas, tallos, vainas, carpelos y semillas, dependiendo del estado fenológico. Todas las estructuras se secaron durante 72 horas a 60 °C y luego se pesaron. En R₇, también se recogieron las hojas caídas y se incluyeron en la biomasa total. Los cálculos de contenidos de N de cada estructura y balances de N se realizaron en base a materia seca. En la madurez, se cosecharon además dos hileras centrales de 15 m de largo para estimación del rendimiento de semillas, el cual se ajustó a un contenido de humedad estándar de 13,5% de humedad. El índice de cosecha se calculó como la relación entre la semilla y la biomasa aérea, y biomasa total incluyendo las estructuras subsuperficiales (IC_{BA} y IC_{BT}, respectivamente).

2.2.3 Absorción de nitrógeno y fijación biológica del nitrógeno

Se determinaron dos orígenes del N: i) N procedente de la fijación biológica y ii) N procedente del suelo. Para determinar el N total de la planta y la FBN, se molieron muestras secas de biomasa de cada estructura vegetal hasta obtener un polvo fino (malla de 0,5 mm). A continuación, en cada muestra se determinó la concentración total de N (%N) y abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$ ‰) (Tabla 2.4 Anexo) en un espectrómetro de masas (MBL - Stable Isotope Laboratory, Woods Hole, MA, EE.UU.). La absorción de nitrógeno en cada estructura se obtuvo multiplicando el %N por su respectiva biomasa. La absorción de N de la biomasa subsuperficial (N-BS) se calculó como la suma del N de raíces y nódulos. Es importante señalar que este N-BS puede estar subestimado, ya que la biomasa subsuperficial recogida sólo representa una parte de la biomasa subsuperficial total a profundidad. Además, no se tuvo en cuenta el N liberado por rizodeposición o por degradación de raíces y nódulos. La absorción vegetativa de N de la biomasa aérea (N-BA_{veg}) se calculó como la suma del contenido de N en tallos, hojas, vainas y carpelos, dependiendo del estado fenológico. En la madurez fisiológica también se calculó la absorción de N por las semillas (N-Semilla). La absorción total de N (N-Tot) se calculó como la suma de N-BA_{veg}, N de semilla (sólo en el estado R₇), y N-BS. El índice de cosecha de nitrógeno se calculó considerando solo el N de biomasa aérea, y también el N de la biomasa total (incluyendo estructuras subsuperficiales), (ICN_{BA} y ICN_{BT}, respectivamente).

El porcentaje de FBN de la biomasa aérea (%Nd_{fa}) se determinó utilizando el método de abundancia natural de ^{15}N (Shearer y Kohl 1986):

$$\%Nd_{fa} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{referencia}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{soja}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{referencia}} - B} \times 100 \text{ (Ecuación 2.1)}$$

Donde B es $\delta^{15}\text{N}$ considerando las estructuras aéreas de soja totalmente dependientes de la fijación de N que fue -1,032 ‰ (Collino et al., 2015), el $\delta^{15}\text{N}_{\text{referencia}}$ es la abundancia natural de ^{15}N en un cultivo no fijador que depende únicamente del N del suelo, y el $\delta^{15}\text{N}_{\text{soja}}$ es la abundancia natural de ^{15}N de la soja. Se utilizó un $\delta^{15}\text{N}$ ponderado para estructuras vegetativas aéreas (es decir, considerando la concentración en tallos, hojas y carpelos) (Unkovich et al., 2008) y el $\delta^{15}\text{N}$ de la semilla para calcular el %Nd_{fa} de estructuras vegetativas aéreas y de la semilla, respectivamente. El maíz fue el cultivo de referencia en cada unidad experimental (Tabla 2.4 Anexos).

Teniendo en cuenta que el valor B puede ser diferente entre las semillas y las estructuras vegetativas, como demostraron Bergersen et al., (1992), se realizó un análisis de sensibilidad comparando, la estimación del %Nd_{fa} utilizando el mismo valor B de -1,032 para las semillas y las estructuras vegetativas aéreas, y la estimación del %Nd_{fa} utilizando -1,032 para las estructuras vegetativas aéreas y -0,66 para las semillas (Bergersen et al., 1992). El objetivo fue determinar si las diferencias en el valor B de las distintas estructuras producen cambios significativos en la proporción de FBN y la cantidad de N-FBN. No se observaron diferencias entre ambos enfoques (Figura 2.7 y 2.8 Anexo) con una RCME del 6.75% y un error relativo del 6%. Por lo tanto, utilizamos el valor B de referencia local para las estructuras aéreas para calcular el %Nd_{fa} de la semilla y las estructuras vegetativas aéreas.

El porcentaje de fijación biológica de N en estructuras vegetativas aéreas se utilizó para calcular la cantidad de N de fijación biológica a partir de la absorción acumulada de N vegetativo aéreo entre los estadios fenológicos (E-R₂, R₂-R₅ y R₅-R₇), y la cantidad acumulada de fijación biológica de N se calculó como la suma de las contribuciones de cada estadio fenológico (Herridge et al., 1990).

Asumiendo que la proporción de fijación biológica de N era similar al comparar estructuras aéreas y subsuperficiales (Carranca et al., 2015; Rymuza et al., 2020) utilizamos la proporción de FBN estimada en la biomasa aérea para estimar el N-FBN subsuperficial (N-FBN BS).

A continuación, el N fijado total (N_{FBN}BT) (kg N ha⁻¹) se determinó como la suma de N-FBN vegetativo aéreo (N_{FBN}BA_{veg}), N-FBN de la biomasa subsuperficial y N-FBN de semillas según el estadio fenológico. Por último, se consideró que la absorción de N que no procedía de la fijación biológica de N procedía del N absorbido del suelo.

Se calculó el balance parcial de N como N-FBN menos N exportado con semillas, pero teniendo en cuenta N_{FBN}BA_{veg} para el balance parcial de N aéreo (BP_{BA}), y N_{FBN}BT para el balance parcial de N biomasa total (BP_{TB}), incluyendo el N-FBN de estructuras subsuperficiales.

$$BP_{BA} = N_{FBN}BA - N_{\text{semilla}} \text{ (Ecuación 2.2)}$$

$$BP_{TB} = N_{FBN}BT - N_{\text{semilla}} \text{ (Ecuación 2.3)}$$

2.2.4 Fuentes de nitrógeno para las semillas

Las fuentes de nitrógeno para la semilla fueron: i) el N removilizado aparente de las estructuras vegetativas y ii) la ganancia de N durante el periodo de llenado de la semilla.

Se calculó la removilización aparente de N (NRemov) de cada estructura vegetativa hacia las semillas (vegetativa aérea y subsuperficial), según Ortiz et al., (2019) como la diferencia de N absorbido en estructuras vegetativas entre los estadíos R_5 y R_7 . El término "aparente" se utiliza para indicar que las estimaciones de removilización se obtuvieron por sustracción y no por medición directa (Salvagiotti et al., 2009). Estos cálculos no tienen en cuenta las eficiencias de respiración y movilización (Dingkuhn y Le Gal, 1996). Se realizaron los cálculos del N aparente removilizado independientemente para cada estructura y origen, es decir, absorción de N del suelo ($Suelo_{Remov}$) y FBN ($N-FBN_{Remov}$).

$$N - Suelo_{Remov} = (R_{5\ N-suelo} - R_{7\ N-suelo}) \text{ (Ecuación 2.4)}$$

$$N - FBN_{Remov} = (R_{5\ FBN} - R_{7\ FBN}) \text{ (Ecuación 2.5)}$$

La removilización total aparente de N (N-Tot Remov) se calculó como la suma del N removilizado del suelo y el N removilizado de FBN de las estructuras aéreas y subsuperficiales.

La proporción de N aparente removilizado a semillas (% SemillaRemov), se calculó como la relación entre el N total aparente removilizado ($kg\ N\ ha^{-1}$) y el N total en semillas ($kg\ N\ ha^{-1}$).

$$\% \text{ semilla}_{Remov} = \frac{N-TotRemov}{N-semilla} \times 100 \text{ (Ecuación 2.6)}$$

La proporción de N aparente removilizado a la semilla a partir de cada origen de N (es decir, N-FBN o N-Suelo), se calculó como la relación entre el N total aparente removilizado a partir de cada origen y el N total aparente removilizado ($kg\ N\ ha^{-1}$).

Por último, la ganancia aparente de N durante el periodo de llenado de semillas (tanto para el N del suelo como para el N-FBN) se calculó como la diferencia entre el N de las semillas y el N aparente removilizado y también se calculó como proporción del N de las semillas.

2.2.5 Análisis de datos

Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2011) para evaluar los efectos del año, el grupo de madurez, condición hídrica y sus interacciones en todas las variables medidas. Para probar los efectos de año, se utilizó la repetición dentro del año como término de error (Gómez y Gómez,

1984). Las diferencias entre BP_{BA} y BP_{TB} se compararon como variables apareadas. Las comparaciones de pendientes y ordenadas al origen se realizaron mediante test T-student utilizando el programa GraphPad Prism 6.01.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Condiciones meteorológicas

La distribución de las precipitaciones y la temperatura durante la campaña varió notablemente entre los dos periodos experimentales (Figura 2.1). Las precipitaciones acumuladas en el primer año fueron de 210 mm entre E-R₂, 220 mm entre R₂-R₅, y 192 mm entre R₅-R₇, (total 630 mm). El tratamiento bajo riego recibió solo 50 mm antes del periodo de llenado de granos. Por el contrario, en 2017/18 las precipitaciones totales fueron un 44 % inferiores en comparación con los registros históricos, 140 mm, 67 mm y 38 mm para los periodos E-R₂, R₂-R₅ y R₅-R₇, respectivamente (total 245 mm) para el tratamiento de secano. En este periodo, se suministraron 270 mm en los tratamientos bajo riego, aplicando el 15, 42 y 43% en los estadíos E-R₂, R₂-R₅ y R₅-R₇, respectivamente.

La temperatura media máxima durante 2016/17 no difirió de la media histórica, mientras que en 2017/18 fue un 9% y un 13% más cálida durante R₂-R₅ y R₅-R₇ (Figura 2.1).

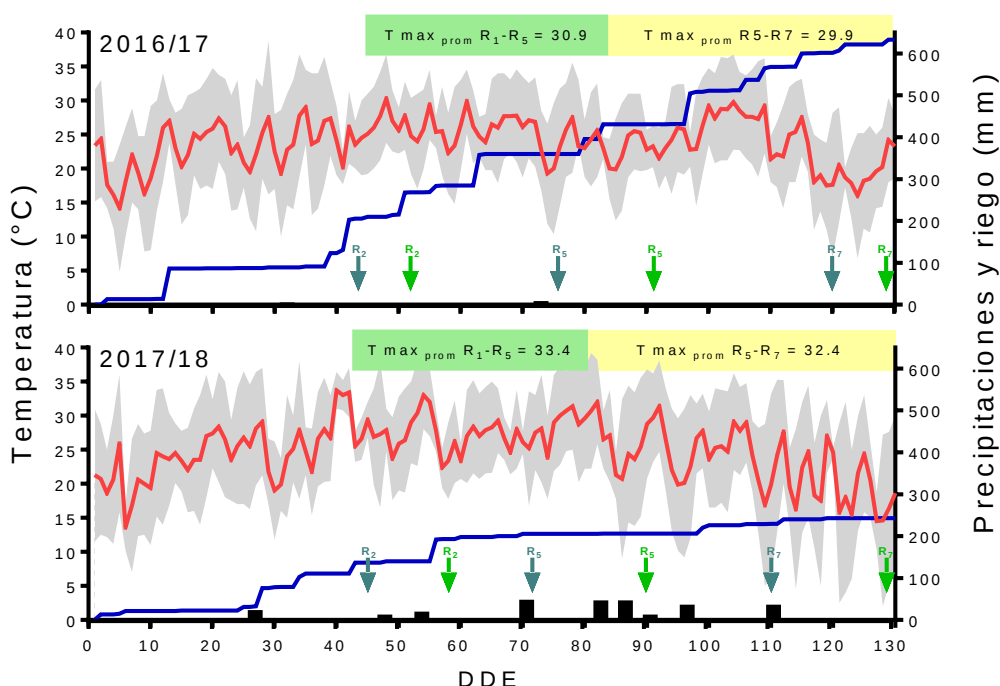


Figura 2.1. Condiciones meteorológicas durante las campañas 2016/17 y 2017/18. La línea roja y la zona sombreada gris representan el rango de temperaturas medias, máximas y mínimas del aire, respectivamente. Línea escalonada (azul) y barras negras representan precipitación acumulada y riego, respectivamente. Las flechas verdes oscuro y verde claro son los estadios fenológicos para GM IV y V respectivamente. DDE; días después de la emergencia.

2.3.2 Rendimiento, producción de biomasa e índice de cosecha

El rendimiento de semilla promedió 5110 y 2973 kg ha⁻¹ en las campañas 2016/17 y 2017/18, respectivamente (Figura 2.2) y mostró interacción significativa A x GM x CH ($p < 0,01$). Los tratamientos de riego y GM no mostraron efectos significativos en el primer año, pero afectaron en gran medida al rendimiento de la soja en el segundo año. En esta última campaña, el rendimiento medio fue de 3845 y 2100 kg ha⁻¹ en los tratamientos bajo riego y secano, respectivamente (Figura 2.2), y el rendimiento del GM IV fue 3336 kg ha⁻¹, un 28% superior al GM V.

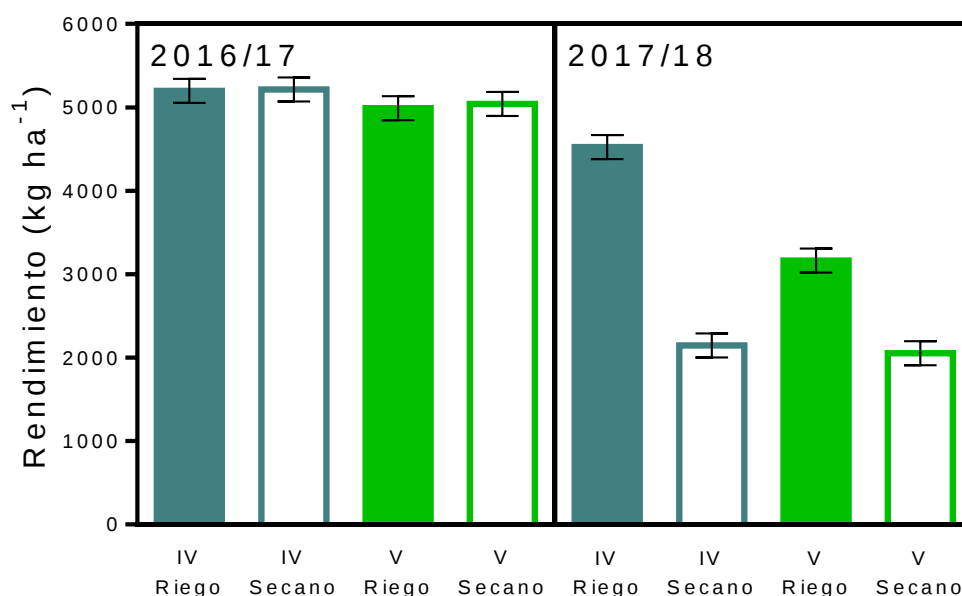


Figura 2.2. Rendimiento de semilla (kg ha⁻¹) ajustado al contenido de humedad estándar de 13,5% en las campañas agrícolas 2016/17 y 2017/18 para dos variedades pertenecientes a GM IV y V en condiciones de riego y secano. Las barras de error representan el error estándar de la media.

No hubo interacción significativa A x GM x CH para la biomasa aérea y subsuperficial en ningún estadio fenológico (Tabla 2.1). En R₂, la biomasa aérea fue de 2706 kg ha⁻¹ para el GM V, un 84 % superior al GM IV, sin embargo, este efecto fue menor para la biomasa subsuperficial, donde el GM V promedió 624 kg ha⁻¹, y solo fue 31% mayor que el GM IV. La biomasa subsuperficial fue 33 % mayor en 2017/18 (627 kg ha⁻¹) que en 2016/17, y 23 % mayor para el tratamiento de secano (607 kg ha⁻¹) en comparación con el tratamiento bajo riego.

En R₅, los efectos de los tratamientos sobre la biomasa aérea fueron similares a los observados en R₂. Se observó interacción A x CH, porque en 2016/17 la biomasa aérea promedió 6371 kg ha⁻¹, sin diferencias entre condiciones hídricas, mientras que en 2017/18 el tratamiento bajo riego alcanzó un promedio de 5993 kg ha⁻¹, siendo 33 % superior al tratamiento de secano (Tabla 2.1). El promedio de biomasa subsuperficial en R₅ fue 996 kg ha⁻¹, observando interacción A x GM, ya que el GM IV alcanzó una biomasa subsuperficial de 1116 kg ha⁻¹, un 18 % superior al GM V en 2016/17, pero en 2017/18, la biomasa subsuperficial del GM IV fue 874 kg ha⁻¹, un 17 % inferior al GM V (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), biomasa aérea (BA) y biomasa total (BT= BS+BA) en los estadios R₂, R₅ y R₇ en soja, afectadas por dos grupos de madurez (GM) y dos condiciones hídricas (CH) durante dos años (A). Los índices de cosecha se calcularon teniendo en cuenta únicamente la biomasa aérea (IC_{BA}) o la biomasa total (IC_{BT}). Se muestran las medias, los errores estándar y los valores p del ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales de A, GM y CH, y sus interacciones.

GM	CH	R ₂			R ₅			R ₇			IC _{BA}	IC _{BT}
		BS	BA	BT	BS	BA	BT	BS	BA	BT		
		kg ha ⁻¹										
2016/17												
IV	RIEGO	354	1277	1631	1032	5513	6546	1194	10789	11983	0,42	0,38
	SECANO	456	1547	2003	1200	6154	7354	1055	11209	12264	0,40	0,37
V	RIEGO	448	2438	2886	955	7194	8149	973	10584	11557	0,41	0,37
	SECANO	631	2977	3608	934	6623	7557	863	10940	11803	0,40	0,37
2017/18												
IV	RIEGO	495	1486	1981	926	4715	5640	1284	11355	12639	0,34	0,31
	SECANO	596	1587	2184	823	3978	4800	994	6368	7362	0,29	0,25
V	RIEGO	672	2809	3481	1099	7272	8371	1176	11252	12428	0,24	0,22
	SECANO	745	2599	3344	996	5042	6038	1147	7092	8239	0,25	0,22
E. E.		41	189	214	55	332	338	101	415	433	0,01	0,004
p valor												
A		<0,01	0,65	0,22	0,28	<0,05	<0,05	0,09	<0,01	<0,05	<0,0001	<0,0001
GM		<0,01	<0,01	<0,0001	0,98	<0,001	<0,0001	0,22	0,9	0,86	<0,0001	<0,0001
CH		<0,01	0,21	0,07	0,71	<0,01	<0,01	0,06	<0,01	<0,0001	<0,001	<0,0001
A * GM		0,63	0,64	0,74	<0,001	0,13	<0,05	0,13	0,36	0,22	<0,0001	<0,0001
A * CH		0,36	0,10	0,11	<0,05	<0,01	<0,01	0,81	<0,01	<0,0001	0,16	<0,001
GM * CH		0,67	0,94	0,99	0,24	<0,05	<0,01	0,33	0,52	0,4	<0,001	<0,001
A* GM * CH		0,36	0,29	0,27	0,24	0,77	0,92	0,43	0,46	0,37	<0,01	<0,001

En R₇, en la campaña 2016/17 no hubo efectos de los tratamientos sobre la biomasa aérea, que alcanzó una media de 10880 kg ha⁻¹, pero en 2017/18, el tratamiento bajo riego alcanzó 11304 kg ha⁻¹, un 68 % superior al de la soja de secano. El aporte promedio de biomasa subsuperficial en este estadio fue de 1086 kg ha⁻¹, sin diferencias estadísticas entre tratamientos (Tabla 2.1).

Promediando ambas campañas, la biomasa subsuperficial recuperada hasta una profundidad del suelo de 30 cm representó el 21, 15 y 10% de la biomasa total en R₂, R₅ y R₇ respectivamente (Tabla 2.1). En 2016/17 los promedios de IC_{BA} e IC_{BT} fueron de 0,42, y 0,37, respectivamente, y no se observaron efectos de los tratamientos en ese año. Por el contrario, en 2017/18, los IC_{BA} e IC_{BT} fueron de 0,28 y 0,25, con una disminución significativa del GM V de aproximadamente el 22 %. La inclusión de estructuras subsuperficiales redujo el valor del índice de cosecha en un 9 % en 2016/17 y riego 2017/18, mientras que los tratamientos en secano de 2017/18 la reducción fue del 13%.

2.3.3 Absorción total de N

La interacción A x GM x CH en la absorción de N solo fue significativa en el estadio R₇ (Tabla 2.2 y 2.3). En R₂, la absorción total de N fue de 76 kg N ha⁻¹ en 2017/18, y de 64 kg N ha⁻¹ en 2016/17 (Tabla 2.2), mientras que el GM V promedió 81 kg N ha⁻¹, un 40 % superior que el GM IV. A pesar de que hubo diferencias significativas en la biomasa subsuperficial en respuesta al GM (Tabla 2.1), no se observaron diferencias en el N subsuperficial (Tabla 2.2), que representó el 13% y el 18% del N total de la planta en 2016/17 y 2017/18 respectivamente.

En R₅, la absorción total de N fue en promedio 164 kg N ha⁻¹, y se observó una interacción significativa A x CH (Tabla 2.2). En 2016/17, no se observaron diferencias entre tratamientos, con una media de 173 kg N ha⁻¹, sin embargo, en 2017/18, en el tratamiento bajo riego fue de 175 kg N ha⁻¹, un 29 % mayor que en el tratamiento de secano. El N subsuperficial promedió 19 kg N ha⁻¹ y representó el 12% de la absorción total de N (Tabla 2.2).

En madurez fisiológica, la absorción total de N promedió 324 y 222 kg N ha⁻¹ en 2016/17 y 2017/18, respectivamente, mientras que en el GM V asimilo 254 kg N ha⁻¹, 13% menor que GM IV (Tabla 2.3). No hubo efectos de CH en la absorción total de N en 2016/17, pero en 2017/18, los tratamientos bajo riego tuvieron un 70% más de absorción total de N que la soja en condiciones de secano. El contenido de N en la semilla en 2017/18 fue de 146 kg N ha⁻¹, un 39 % inferior al de 2016/17, debido principalmente a las condiciones hídricas contrastantes en 2017/18, donde las plantas

bajo riego tuvieron un 80 % más de N en la semilla que las de secano. El nitrógeno en la biomasa subsuperficial representó ca. 4 y 8% del N total de la planta en 2016/17 y 2017/18, respectivamente (Tabla 2.3).

El N de las semillas representó el 74 % y el 66 % de la absorción total de N en 2016/17 y 2017/18, respectivamente (Tabla 2.3) y, al igual a lo observado con el índice de cosecha de biomasa, la inclusión del N de la biomasa subsuperficial implicó una reducción global del índice de cosecha de N de aproximadamente el 6 % (Tabla 2.3).

Tabla 2.2. Nitrógeno absorbido total (N) y N fijado (N_{FBN}) en la biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), biomasa vegetativa aérea (BAVeg) y biomasa total (N-Tot) en los estadios R_2 , R_5 en soja, afectados por dos diferentes grupos de madurez (GM) y dos diferentes condiciones hídricas (CH) durante dos años (A). Se muestran las medias, los errores estándar y los valores p del ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales de A, GM y CH, o sus interacciones. También se presenta el porcentaje de fijación biológica de N (Ndfa).

GM	CH	R ₂ - N total absorbido			R ₂ - N ₂ Fijado				R ₅ - N total absorbido			R ₅ - N ₂ Fijado			
		N-BA _{veg}	N-BS	N-TB	N _{FBN} BA _{veg}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT	Ndfa	N-BA _{veg}	N-BS	N-TB	N _{FBN} BA _{veg}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT	Ndfa
		kg N ha ⁻¹			%				kg N ha ⁻¹			%			
2016/17															
IV	RIEGO	36	6	42	26	4	30	68	147	21,9	169	116	17	133	79
	SECANO	49	9	58	35	7	42	71	156	22,6	178	112	16	128	73
V	RIEGO	62	7	69	53	6	59	84,7	158	14,6	172	132	12	144	84
	SECANO	75	9	84	59	7	66	78,5	159	15,5	174	125	12	137	79
2017/18															
IV	RIEGO	51	11	62	34	7	42	67	141	20,1	161	105	15	119	74
	SECANO	54	14	69	33	9	41	61	114	19,2	134	77	13	90	67
V	RIEGO	77	13	91	49	8	57	62,6	168	20,5	188	123	15	138	73
	SECANO	65	16	81	53	13	66	80,5	120	18,4	138	90	14	104	75
E.E.		6,0	1,2	6,3	5,6	0,9	6,0	5,0	10,4	1,5	10,5	9,6	1,3	9,8	3,3
p valor															
A		0,15	<0,001	<0,05	0,8	<0,001	0,5	<0,01	0,09	0,5	0,14	<0,01	0,79	<0,05	<0,05
GM		<0,001	0,18	<0,0001	<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,05	0,13	<0,01	0,29	<0,05	<0,05	0,07	<0,05
CH		0,34	<0,01	0,13	0,27	<0,01	0,13	0,56	<0,05	0,77	<0,05	<0,05	0,3	<0,05	0,09
A * GM		0,42	0,47	0,52	0,32	0,26	0,45	0,52	0,53	<0,01	0,29	0,93	<0,05	0,66	0,56
A * CH		0,05	0,74	0,07	0,42	0,36	0,53	0,29	<0,05	0,3	<0,05	0,08	0,58	0,08	0,53
GM * CH		0,37	0,76	0,36	0,89	0,39	0,8	0,31	0,33	0,82	0,32	0,72	0,71	0,78	0,27
A * GM * CH		0,39	0,86	0,42	0,59	0,1	0,42	<0,05	0,66	0,72	0,63	0,96	0,97	0,96	0,41

Tabla 2.3. Nitrógeno (N) total absorbido y N fijado (N_{FBN}) en la biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), la biomasa vegetativa aérea (BA_{veg}), la semilla (Sem), la biomasa total (N-Tot) en el estadio R_7 , y el porcentaje de fijación biológica de N (Ndfa) total en la planta (%) en soja, afectados por dos diferentes grupos de madurez (GM) y dos diferentes condiciones hídricas (CH) durante dos años (A). Los índices de cosecha de nitrógeno se calcularon teniendo en cuenta sólo el N aéreo (ICN_{BA}) o el N total (ICN_{BT}). Se muestran las medias, el error estándar (E.E) y los valores p del ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales de A, GM y CH, y sus interacciones.

GM	CH	R ₇ - N total absorbido				R ₇ - N ₂ Fijado					ICN _{BA}	ICN _{BT}
		N-BA _{veg}	Sem N	N-BS	N-BT	N _{FBN} BA _{veg}	Sem N _{FBN}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT	Ndfa		
		kg N ha ⁻¹								%		
2016/17												
IV	RIEGO	77	256	17	351	64	197	13,9	275	78	0,77	0,73
	SECANO	92	249	15	355	67	170	10,3	247	70	0,73	0,70
V	RIEGO	52	239	11	303	57	185	9,6	251	83	0,82	0,79
	SECANO	65	212	10	287	55	149	7,4	212	74	0,77	0,74
2017/18												
IV	RIEGO	68	217	22	307	49	178	18,3	245	79	0,76	0,71
	SECANO	41	100	16	157	14	78	10,2	102	64	0,71	0,64
V	RIEGO	75	159	18	253	50	127	13,3	191	75	0,68	0,63
	SECANO	48	108	15	172	29	83	11,0	122	71	0,69	0,63
E. E.		7,4	8,6	2,22	13,5	5,3	8,7	1,99	12,5	3,5	0,02	0,02
p valor												
A		<0,05	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	<0,001	0,29	<0,01	<0,001
GM		0,09	<0,001	<0,05	<0,001	0,89	0,05	0,08	0,06	0,36	0,79	0,1
CH		0,21	<0,001	0,05	<0,0001	<0,01	<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,05	<0,05	<0,05
A * GM		<0,01	0,88	0,38	0,06	0,05	0,74	0,63	0,58	0,6	<0,01	<0,01
A * CH		<0,01	<0,001	0,49	<0,0001	<0,01	<0,05	0,47	<0,01	0,94	0,35	0,87
GM * CH		0,88	0,08	0,37	0,22	0,62	0,23	0,26	0,19	0,42	0,4	0,4
A * GM * CH		0,9	<0,01	0,64	<0,05	0,32	0,11	0,49	0,08	0,38	0,18	0,14

2.3.4 Fijación biológica del N

En el estadío R_2 , la soja acumuló 49 kg de N-FBN en biomasa aérea y subsuperficial en 2016/17, representando el 77 % de la absorción total de N, disminuyendo al 68 % en 2017/18. Los grupos de madurez IV y V mostraron un %Ndfa promedio de 67 y 77%, respectivamente (Tabla 2.2). El N proveniente de FBN en las estructuras subsuperficiales representó aproximadamente el 13 % y el 18 % del N total derivado de fijación biológica en R_2 en 2016/17 y 2017/18, respectivamente (Tabla 2.2) y representó el 11 % del N total absorbido.

En R_5 , se observaron efectos significativos en respuesta a A y GM para el %Ndfa en biomasa total, alcanzando valores del 79% y 72% en 2016/17 y 2017/18, y del 73% y 78% para los genotipos GM IV y V, respectivamente (Tabla 2.2). En términos absolutos, la FBN total promedió 136 kg N ha⁻¹ en 2016/17 y 113 kg N ha⁻¹ en 2017/18. Las diferencias observadas debidas a la condición hídrica en 2017/18 explicaron la interacción A x CH ($p < 0,08$), donde la soja bajo riego fijó 1,32 veces más N que el tratamiento de secano. La fijación biológica de N en estructuras subsuperficiales contribuyó con ca. 11% y 13% de la fijación biológica total de N en R_5 en 2016/17 y 2017/18, respectivamente, y representó el 9% del N total absorbido (Tabla 2.2).

En R_7 , se observó un efecto significativo de la CH para %Ndfa, con una media del 79% para el tratamiento bajo riego y disminuyendo hasta el 70% en el de secano (Tabla 2.3). En términos absolutos, la FBN total mostró interacción significativa A x CH explicada principalmente por las diferencias de la CH de 2017/18. La fijación biológica total de N en 2017/18 promedió 112 kg N ha⁻¹ en los tratamientos de secano y aumentó a 218 kg N ha⁻¹ en el tratamiento con riego. Por el contrario, no se observaron efectos del riego en 2016/17, con una media de 246 kg N ha⁻¹. El nitrógeno derivado de la fijación biológica en semillas alcanzó una media de 175 kg N ha⁻¹ en 2016/17. En 2017/18, esta variable fue de 153 kg N ha⁻¹ en la soja bajo riego, 1,9 veces superior al tratamiento de secano. El N de fijación biológica en estructuras subsuperficiales fue en promedio de 12 kg N ha⁻¹, y representó el 4% y el 8% de la fijación biológica total de N en 2016/17 y 2017/18, respectivamente, contribuyendo respectivamente con un 3% y 6% del N total absorbido (Tabla 2.3).

2.3.5 Ganancia y removilización aparente de N durante el periodo de llenado de semillas

La removilización y ganancia aparente de N durante el periodo de llenado de la semilla fue del 49 y 51%, respectivamente, del contenido total de N en la semilla (Figura

2.3 a). Sin embargo, se observó una interacción significativa A x CH para la ganancia de N, sin diferencias entre los tratamientos de CH en 2016/17 y una reducción significativa de la ganancia aparente de N en el tratamiento de secano en 2017/18.

La ganancia aparente de N durante el periodo de llenado de la semilla ($R_5 - R_7$) fue de 151 kg N ha^{-1} en 2016/17 (63% del N total de la semilla). En 2017/18, la ganancia aparente de N en la soja bajo riego fue de 105 kg N ha^{-1} , 3,8 veces mayor que en el tratamiento de secano, representando el 53 y el 26 % del N total de la semilla, respectivamente (Figura 2.3 a). En promedio, el 29% de la ganancia aparente de N provino del N del suelo y el 71% del N-FBN. En 2016/17, el 27 % y el 73 % de la ganancia total de N aparente procedieron del N del suelo y de N-FBN, respectivamente, lo que representó el 17 % y el 50 % del N total de la semilla (Figura 2.3 a). Por el contrario, en 2017/18, la ganancia aparente de N procedente de FBN fue de aproximadamente el 84 y el 52 % de la ganancia aparente total de N para los tratamientos de riego y secano, respectivamente, lo que representa el 44 y el 13 % del N total de la semilla (Figura 2.3 a).

El promedio de N aparente removilizado a semillas fue de 84 kg N ha^{-1} (Figura 2.3 a), con valores más altos para el GM V que superó al GM IV en 29% ($p < 0,05$) (94 y 73 kg N ha^{-1} , respectivamente). La proporción de N de semilla proveniente de la removilización aparente mostró una interacción A x CH significativa, promediando 37% en 2016/17 sin efectos de CH, pero en 2017/18, el N removilizado aparente en plantas de soja de secano representó ca. 74% del N de semilla, mientras que fue 47% en condiciones de riego (Figura 2.3 a).

En 2016/17, el 27 y 73 % de la removilización total aparente de N provino del N del suelo y de FBN, respectivamente, representando el 10 y el 27 % del N total de las semillas (Figura 2.3 a). Por el contrario, en 2017/18, el N proveniente de la removilización aparente de FBN representó aproximadamente el 76 y el 86 % del N aparente total removilizado a las semillas para los tratamientos de riego y secano, respectivamente, representando el 36 y el 64 % del N total de las semillas (Figura 2.3). A pesar del origen (suelo o FBN) del N aparente removilizado a la semilla, la mayoría provino de estructuras vegetativas aéreas (94,5%), mientras que sólo el 5,5% provino de la removilización de N aparente subsuperficial (Figura 2.3 b), sin diferencias significativas entre tratamientos de riego y genotipo. El promedio de N aparente subsuperficial removilizado a las semillas fue de aproximadamente 5 kg N ha^{-1} , del cual 81 y 19% provino de FBN y N del suelo respectivamente (Figura 2.3 b).

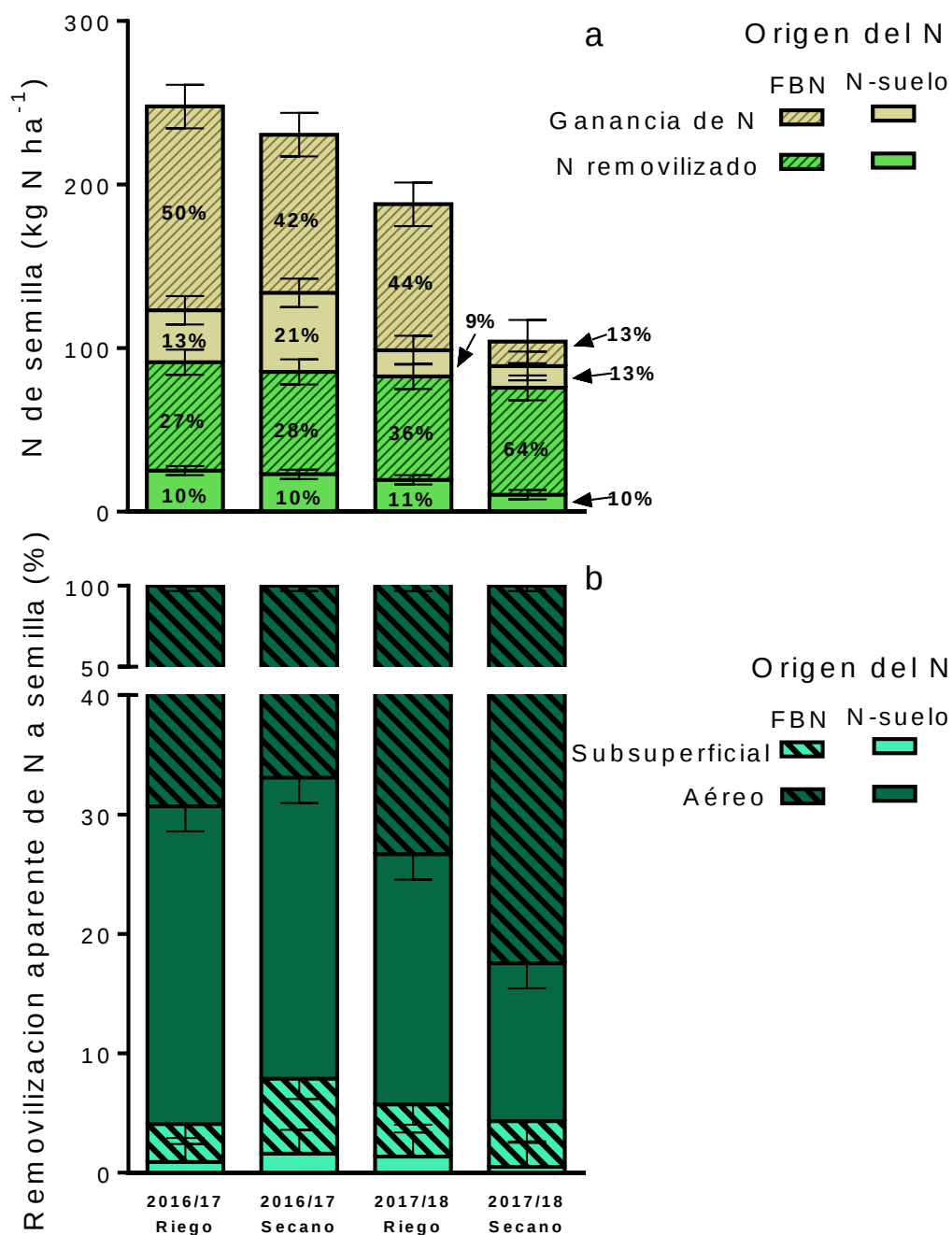


Figura 2.3. a) Contribución de la composición de N de la semilla de dos fuentes: N aparente removilizado (N vegetativo en R_5 menos N vegetativo en R_7) y ganancia aparente de N (N adquirido durante el periodo de llenado de la semilla) según el origen (FBN o del N del suelo). Los números indican la proporción de cada fuente y origen, y b) contribución relativa del N removilizado aparente total a la semilla procedente de estructuras aéreas (vainas, hojas y tallos) y subsuperficial (raíces y nódulo hasta 30 cm de profundidad) de diferentes orígenes (FBN o N-suelo), en relación a dos condiciones

hídricas contrastantes (riego y secano) durante dos años sucesivos (2016/17 y 2017/18). Cada columna es la media de dos variedades pertenecientes a grupos de madurez IV y V. Las barras de error representan el error estándar.

2.3.6 Balance parcial de N

El balance parcial incluyendo N-FBN aéreo o N-FBN total, no mostró diferencias significativas debidas a A, CH o GM, y no difirieron al analizar cada campaña de forma independiente. Cuando solo se incluyó el N-FBN aéreo, el balance parcial de N fue de -3 y +6 kg N ha⁻¹ en 2016/17 y 2017/18 respectivamente, pero como era de esperar, cuando se incluyó el N-FBN subsuperficial, los valores aumentaron significativamente ($p < 0,001$) a +7 y +19 kg N ha⁻¹ (Figura 2.4).

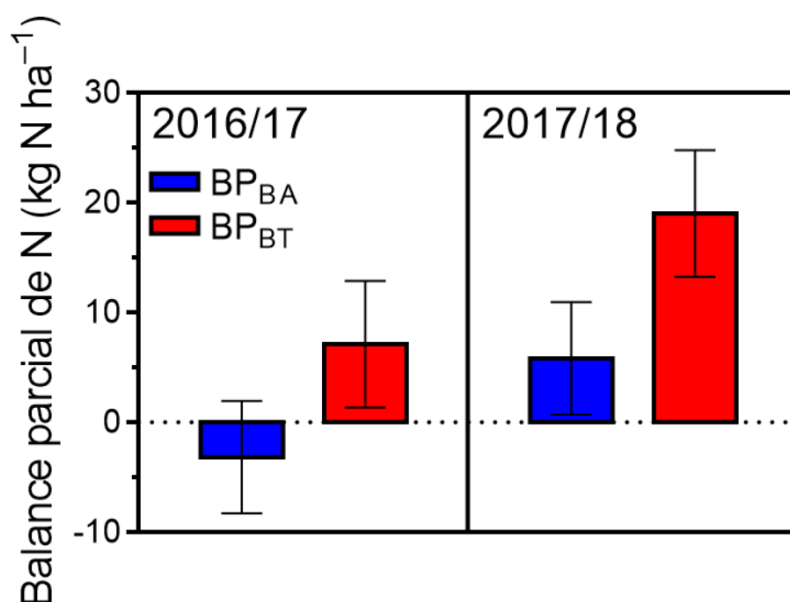


Figura 2.4. Balance parcial de N de soja (kg N ha⁻¹) en dos campañas, calculado como; la fijación biológica de N menos el N exportado con las semillas, teniendo en cuenta la fijación biológica de N en estructuras aéreas (BP_{BA}), o incluyendo las estructuras subsuperficiales hasta una profundidad del suelo de 30 cm (BP_{BT}). Cada barra representa la media de dos grupos de madurez diferentes (GM) bajo dos condiciones hídricas (CH). Las barras de error representan el error estándar.

El resultado del balance parcial de N con la inclusión de aportes de estructuras subsuperficiales y sin la inclusión de las mismas, no demostró relación con el rendimiento promedio de cada tratamiento y año (Figura 2.5 anexo).

La pendiente de la regresión entre %Ndfa y el balance parcial es una medida del aumento del balance parcial de N por unidad de %Ndfa. Resolviendo la ecuación para $Y=0$ se indica el %Ndfa en el que se alcanza un balance neutro (es decir, igual a 0). La Figura 2.6 muestra estas regresiones calculadas a partir de los balances parciales de N total y N aéreo. No se observaron diferencias entre las pendientes de los balances parciales de N total y N aéreo en ambos años (2016/17 $p=0,76$, 2017/18 $p=0,32$), indicando un aumento del balance parcial de aproximadamente 2,39 y 2,29 kg N ha^{-1} por unidad de aumento del %Ndfa en 2016/17 y 2017/18 respectivamente. La ordenada al origen fue significativamente diferente en cada año (2016/17 $p<0,06$, 2017/18 $p<0,01$). Resolviendo ambas ecuaciones para $Y=0$, si se considera únicamente la FBN a partir de la biomasa aérea, se observaron balances positivos cuando el %Ndfa fue superior al 78 y 70 %, para 2016/17 y 2017/18 respectivamente (Figura 2.6). Sin embargo, este valor disminuyó a 74 y 65 %, al incluir la fijación biológica de N de estructuras subsuperficiales (Figura 2.6).

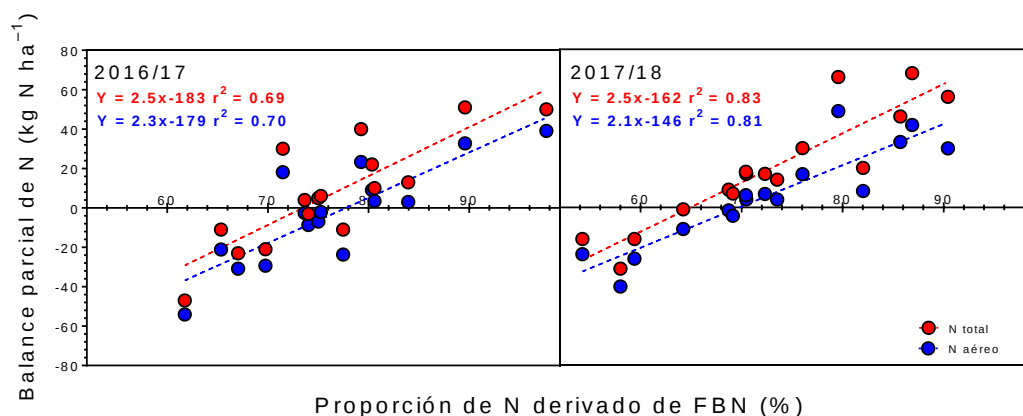


Figura 2.6. Relación entre el balance parcial de N (kg N ha^{-1}) y la fijación biológica de N_2 (%Ndfa) para las campañas 2016/17 y 2017/18. Los puntos rojos y azules representan el N total (incluido el N subsuperficial recuperado hasta una profundidad de 30 cm) y el N aéreo, respectivamente.

2.4 DISCUSIÓN

El N de fijación biológica, la absorción de N y el N exportado con las semillas están estrechamente relacionados y definen el balance parcial de N de los cultivos de leguminosas y la contribución neta de FBN al agroecosistema. A escala global, revisiones recientes en el cultivo de soja en condiciones de campo (Ciampitti y Salvagiotti 2018; Salvagiotti et al., 2008) estimaron una necesidad promedio de N de 80

kg N por Mg de rendimiento de semilla, y una contribución de N-FBN que oscila entre 0 y 372 kg N ha⁻¹, dependiendo de la proporción de N derivado de la FBN. Estos autores indicaron que estas estimaciones debían interpretarse con precaución, porque la mayoría de los estudios publicados no tienen en cuenta los aportes de estructuras subsuperficiales, por lo tanto, las necesidades de N serían mayores. Asimismo, existe un consenso general en que la cuantificación de las estructuras subsuperficial es crucial para comprender el papel del cultivo de soja en el ciclo del N y mejorar las estimaciones del balance de N (Anglade et al., 2015; Ciampitti y Salvagiotti 2018; Unkovich et al., 2008). La incertidumbre sobre la contribución de las estructuras subsuperficiales al balance parcial de N está relacionada con la complejidad en la recuperación de raíces y nódulos en condiciones de campo y también con el papel de los exudados radicales. Por esta razón, la ambigüedad en la estimación del N subsuperficial se debe principalmente a la cuantificación de la biomasa más que a la estimación de la concentración de N en los tejidos (McNeill et al., 1997). En esta tesis, la recuperación física de las estructuras subsuperficiales se obtuvo por el método del monolito, en el que la biomasa radical y la heterogeneidad espacial se cuantifican mejor en comparación con el método del cilindro, que puede producir una sobreestimación del sistema radical (Nissen et al., 2008; Ping et al., 2010). En el presente estudio, la biomasa subsuperficial recuperada a una profundidad de 30 cm representó el 21, 15 y 10% de la biomasa total en los estadíos R₂, R₅ y R₇, respectivamente. Estas proporciones coinciden con estudios de campo anteriores realizados en diversas condiciones ambientales (Cheng et al., 2003; Gelfand y Philip Robertson, 2014; Mayaki et al., 1976; Roder et al., 1989). Fan et al., (2016); Purcell et al., (1998) estimaron que alrededor del 68% del sistema radical se concentra en los 30 cm superiores del perfil. Aplicando esta proporción a nuestras mediciones, la biomasa subsuperficial de todo el sistema radical habría alcanzado los 1517 kg ha⁻¹ en madurez del cultivo, lo que representa el 14% de la biomasa total. Del mismo modo, encontramos que la proporción de N contenida en las estructuras subsuperficiales fue en promedio del 16%, 12% y 6% en R₂, R₅, y R₇, lo que confirma la contribución relativamente baja de las estructuras subsuperficiales, que son una fuente relevante pero no primaria para el N de las plantas de cosecha de granos (Christophe et al., 2011).

La estimación precisa de la biomasa subsuperficial también es importante para calcular el carbono retenido como materia orgánica. Estudios previos mostraron que la proporción de carbono que finalmente se retiene como materia orgánica estable puede ser 10 veces mayor para los residuos subsuperficiales que para los residuos aéreos (Jackson et al., 2017; Katterer et al., 2011; Mazzilli et al., 2015). Esto indica que pequeños cambios en los residuos bajo el suelo podrían dar lugar a grandes diferencias

en la formación de carbono orgánico estable en el suelo. En comparación con otros cultivos que suelen compartir la misma rotación (por ejemplo, maíz y trigo), el cultivo de soja devuelve una baja cantidad de residuos al suelo, por lo que una alta proporción de este cultivo dentro de una secuencia de rotación afecta los reservorios de C orgánico del suelo (Novelli et al., 2011; Varela et al., 2014). Dado que las dinámicas de C y N del suelo están estrechamente relacionadas, se espera una reducción similar en el N orgánico del suelo asociado a la baja cantidad de residuos bajo el suelo. Por otro lado, la importancia de los exudados radicales en los balances de N de los cultivos y la identificación del origen de la rizodeposición (N-suelo o N-FBN) es difícil de estimar en condiciones de campo. Aunque hasta la fecha se han realizado avances interesantes en este tema (Fustec et al., 2010; Laberge et al., 2009; Wang et al., 2021) se trata, sin duda, de una de las áreas en las que es necesario intensificar los esfuerzos de investigación para conseguir una mayor aproximación al balance real de N.

Los resultados del balance parcial de N de la campaña 2016/17 indicaron que la inclusión de estructuras subsuperficiales cambió el balance parcial de N de negativo a positivo, por lo tanto, no se rechaza la primera hipótesis afirmando que la inclusión del N subsuperficial derivado de FBN cambia el balance parcial de N de la soja de negativo a positivo. En 2017/18, el balance parcial de N fue positivo incluso sin tener en cuenta las estructuras subsuperficiales (Figura 2.4). Nuestros resultados concuerdan con Ciampitti y Salvagiotti (2018), quienes indicaron que se deben esperar balances parciales positivos cuando el %Nd_{fa} es mayor al 73%. Sin embargo, el balance parcial de N tendió a ser mayor en el segundo año, probablemente debido a los menores rendimientos y, en consecuencia, a las menores exportaciones de N con las semillas.

En esta tesis se observó que se pueden alcanzar balances positivos cuando el % Nd_{fa} total de la planta está por encima del 65%, y que después de incluir el N derivado de FBN en raíces y nódulos (hasta 30 cm de profundidad), el balance parcial de N aumentó significativamente ca. 12 kg N ha⁻¹. Aplicando la corrección mencionada anteriormente en estadio R₇, para estimar la biomasa total de raíces a partir de mediciones realizadas en los 30 cm superiores (Fan et al., 2016), la cantidad de N derivado de FBN presente en las raíces enteras se elevaría a 16 kg N ha⁻¹ y los balances parciales resultarían de 10 y 23 kg N ha⁻¹ en 2016/17 y 2017/18, respectivamente. A escala de lote, aunque estos 16 kg adicionales de N procedentes de FBN no conducirían a balances positivos generalizados, sugieren que es probable que se obtengan balances neutros. Cuando estos usan para estimaciones a escala nacional o regional, las contribuciones estimadas de N subsuperficial alcanzan una magnitud que claramente merece su inclusión en las estimaciones del presupuesto de N. Por ejemplo, aplicando estas estimaciones a la superficie sembrada con soja en Argentina de 19 millones de ha

(Rubio et al., 2019), el aporte de N-FBN subsuperficial alcanzaría unos 300.000 Mg N por año. Es importante destacar que, en el presente estudio, se consideró que la proporción de N derivado de FBN en las estructuras subsuperficiales era similar a la cuantificada en las estructuras aéreas. Esta suposición se realizó en base a estudios previos que mostraron valores similares de %Ndfa tanto para estructuras aéreas como subsuperficiales (Carranca et al., 2015; Rymuza et al., 2020). Una estimación más precisa de la contribución de las estructuras subsuperficiales, y por lo tanto del balance parcial de N, podría lograrse si se utiliza un valor B específico para las raíces y los nódulos, que suelen tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ mayores que las estructuras aéreas (Shearer et al., 1980; Unkovich et al., 2008; Werner y Schmidt, 2002) especialmente cuando se obtienen valores de %Ndfa elevados. Okito et al., (2004) observaron que la inclusión de las raíces reducía el valor B un 24% en comparación con el valor B estimado únicamente para la biomasa aérea, e incluso se reducía un 45% cuando también se incluían los nódulos. Además, se puede perfeccionar la estimación de la FBN utilizando diferentes valores B para la semilla y los tejidos vegetativos.

En el presente estudio, el impacto negativo del déficit hídrico ocurrido en la campaña 2017/18 fue más fuerte en el N-FBN total (- 47%) que en la absorción total de N del suelo (-16%) y la acumulación total de materia seca (-42%), lo que sugiere una mayor sensibilidad de la FBN al estrés hídrico (Purcell y King, 1996; Purcell et al., 2004). Estos resultados apoyarían que los cultivos bajo estrés hídrico muestran una menor absorción de N tanto de FBN como del suelo, debido a que la reducción del flujo del floema limita la actividad de los nódulos (Serraj et al., 1999) y la reducción del flujo de agua de transpiración limita el suministro de N del suelo. En estos experimentos, los efectos del déficit hídrico en la absorción de N y N-FBN fue mayor que el efecto del genotipo, como lo muestra el efecto más fuerte de A x CH que la interacción A x GM. Bacigaluppo et al., (2011) demostró que los diferentes grupos de madurez de soja pueden explorar diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, la intensidad de la escasez de agua en el segundo año de nuestro experimento fue lo suficientemente grande como para evitar un "escape fenológico" a este estrés, con un gran impacto en el rendimiento de grano, la absorción de N y la FBN.

La demanda de N de las semillas, que representa el componente de salida del balance parcial de N, puede perjudicar el reciclaje global de N si no es suministrado por FBN. Salvagiotti et al., (2021) observaron que la relación entre el rendimiento de semilla y el N de semilla es lineal, incluso en cultivos de soja de alto rendimiento (alrededor de 6000 kg ha⁻¹), en los que tanto el N del suelo como el N-FBN normalmente pueden no suplir la demanda de N (Cafaro La Menza et al., 2017; Ciampitti y Salvagiotti 2018). Bergersen et al., (1992) observaron que la cantidad de FBN detectada durante el

período de llenado de grano era el doble de la cantidad detectada en etapas anteriores. En el presente estudio, sumando la "ganancia actual aparente" (es decir, el N adquirido durante el período de llenado de la semilla) y el N removilizado aparente, la FBN representó entre el 73 y el 79% del N total de la semilla, en condiciones de estrés y sin estrés respectivamente. Este resultado apoya nuestra segunda hipótesis, que afirma que, independientemente de las condiciones ambientales, la mayor parte del N de la semilla procede del FBN, más que del N del suelo. En ese sentido, se pudieron identificar dos situaciones contrastantes: en condiciones sin estrés hídrico (2016/17 y seco 2017/18), el N-FBN de la semilla procedía principalmente de la "ganancia aparente de N actual", como mostraron Bergersen et al., (1992), mientras que en condiciones de estrés hídrico procedía principalmente del N-FBN removilizado aparente. En ambos casos, el balance parcial de N permaneció positivo, debido a un alto porcentaje (76%) de N de semilla proveniente de FBN.

El N de la semilla es suministrado por el N removilizado de las estructuras vegetativas, y por la absorción de N del suelo y FBN durante el período de llenado de la semilla (Sinclair y de Wit, 1975). Desde la perspectiva de dejar más N al sistema (es decir, una contribución neta de FBN), cuanto mayor sea la removilización de N previamente fijado desde las estructuras vegetativas a las semillas, menores serán las posibilidades de tener balances parciales de N positivos. Igualmente, una contribución neta de FBN al sistema puede ocurrir cuando la ganancia actual de FBN aumenta. Sin embargo, estudios previos de removilización no diferenciaron el origen del N removilizado a las semillas, un aspecto clave para el ciclo del N en agroecosistemas. Esta investigación fue diseñada para llenar este vacío de conocimiento, discriminando el origen final (es decir, suelo o FBN), del N aparente removilizado a las semillas, y la asignación del N en estructuras vegetativas a N de semilla. En promedio, éste estudio mostró que la removilización aparente de estructuras subsuperficiales representó el 2,7% del N de semilla, y la removilización total de N aparente vegetativo representó el 49% del N de semilla, en línea con estudios previos (Bender et al., 2015; Gaspar et al., 2017; Kumudini et al., 2002; Ortez et al., 2018). Sin embargo, esta proporción fue altamente dependiente del estado hídrico experimentado por el cultivo, variando del 41% al 74 % en cultivo bajo riego y con estrés hídrico, respectivamente. Por el contrario, en condiciones de estrés hídrico, la contribución de la ganancia aparente actual de FBN a las semillas se vio más afectada que sin estrés hídrico. En tal sentido, la evidencia recolectada no apoya nuestra tercera hipótesis, ya que la relación N-FBN:N-suelo dentro del N aparente vegetativo removilizado a las semillas fue altamente variable (rango: 2,7 a 6,4). La variabilidad estuvo regulada en mayor proporción por los tratamientos bajo riego, que aumentaron la proporción de N aparente removilizado proveniente de FBN

en condiciones de estrés hídrico. Estos resultados indican la importancia relativa de la fuente y el origen del N. Sin embargo, dado que la removilización aparente y la ganancia actual de N no son mediciones directas, serán necesarias mediciones específicas mediante enriquecimiento de ^{15}N para confirmar estas tendencias.

2.5 CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo llenaron un vacío de conocimiento respecto a la cantidad de N-FBN asignado a raíces y nódulos y sus efectos en el balance de N de los cultivos de soja bajo condiciones contrastantes de disponibilidad hídrica. En promedio, se observó que el N subsuperficial representó el 8 % del N total de la planta y el N derivado de FBN en estructuras subsuperficiales representó entre el 5 y el 13 % de la FBN total, incluso cuando la información fue ajustada para incluir el N adicional potencial que puede haber estado asociado con raíces a mayor profundidad en el perfil del suelo por debajo de 30 cm. Aunque también debe tenerse en cuenta que tales estimaciones son probablemente conservadoras, ya que las contribuciones adicionales de N orgánico liberado en la rizosfera como exudados, o como resultado del reciclado de los pelos radicales, las raíces finas y la senescencia de los nódulos durante el crecimiento del cultivo de soja, no serían detectadas por la técnica de recuperación física utilizada en el presente estudio. El balance parcial de N de la soja fue siempre positivo (es decir, las entradas de N a través de la FBN fueron superiores al N exportado con los granos) cuando se incluyó el N derivado de la FBN presente en raíces y nódulos. Si sólo se consideran las estructuras superficiales, el balance parcial se estimaría negativo en nuestro primer año experimental. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de incluir los componentes subsuperficiales a la hora de estimar los balances de N de los cultivos de soja a diferentes escalas.

Este estudio aporta una perspectiva novedosa en la identificación del origen (N del suelo o FBN) y la fuente (removilización aparente de N o ganancia aparente de N durante el periodo de llenado de grano) del N del grano y su relación con el balance de N. La fijación biológica del N fue el principal origen del N del grano, representando el 73 y el 79% del N de la semilla en condiciones de estrés hídrico y sin estrés, respectivamente. En cuanto al origen del N de la semilla, la contribución relativa de la removilización aparente y de la ganancia actual aparente dependió de las condiciones de crecimiento. Bajo estrés hídrico, la removilización aparente desde las estructuras vegetativas fue el principal contribuyente (74%) al N de la semilla, lo que se explicó principalmente por una mayor removilización aparente relativa del FBN (64%), en lugar del N del suelo (10%). En contraste, bajo condiciones de riego, la ganancia aparente de

N durante el periodo de llenado de la semilla fue el principal contribuyente (59%) al N de la semilla, principalmente de FBN más que del N del suelo (45% y 14%, respectivamente). Por lo tanto, aumentar la ganancia de N durante el periodo de llenado de la semilla parece ser un objetivo clave para mejorar el balance parcial de N cuando se diseñan estrategias de manejo y mejora de cultivos de soja.

CAPÍTULO 3

Contribución de la fijación biológica del nitrógeno en arveja y vicia: al balance parcial de N

Este capítulo fue publicado en: Kehoe, E., Rubio, G. & Salvagiotti, F. Biological nitrogen fixation in field pea and vetch: Contribution from above and belowground structures to the partial nitrogen balance. FCR Volume 316, 1 August 2024, 109514. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2024.109514>

3.1 INTRODUCCIÓN

Los suelos de la Región Pampeana de Argentina son de los más fértiles del mundo, aportando ca. 85 millones de toneladas de producción de cereales y oleaginosas (FAOSTAT 2023; Rubio et al., 2019). Sin embargo, la continua implementación de prácticas agrícolas sin una adecuada reposición de nutrientes ha mermado significativamente los niveles de fertilidad del suelo (Rubio et al., 2019). En las últimas décadas, se ha observado una disminución en los contenidos de C y N del suelo, amenazando los servicios ecosistémicos de provisión, regulación y soporte (Díaz de Astarloa y Pengue, 2018; Novelli et al., 2017; Restovich et al., 2012). Los cultivos de soja y maíz son los principales cultivos comerciales de verano en esta región, ocupando anualmente alrededor de 24M ha, y representando el 14 y el 4 % de la producción mundial, respectivamente (FAOSTAT 2023). Por lo general, ambos cultivos se siembran como único cultivo en el año, después de un largo período de barbecho invernal (5 a 7 meses) o, en menor medida, como doble cultivo (principalmente después de trigo o cebada) (Andrade y Satorre, 2015; Pinto et al., 2017). Ambos cultivos presentan una elevada exportación de N en granos (Piccinetti et al., 2021), reflejado en índices de cosecha de N superiores al 75% y al 64% en soja y maíz, respectivamente (Salvagiotti et al., 2008; Setiyono et al., 2010; Tamagno et al., 2017). Los balances negativos de N suelen observarse en el maíz debido a que los elevados niveles de exportación de N con los granos cosechados no son compensados con las entradas de N a través de la fertilización (Correndo et al., 2021). En soja, los estudios en la región pampeana han mostrado que los aportes de N a través de la FBN pueden satisfacer los requerimientos de N del cultivo (Collino et al., 2015). Sin embargo, este aporte a menudo resulta en balances de N negativos a ligeramente positivos (Ciampitti y Salvagiotti, 2018; Collino et al., 2015; Kehoe et al., 2022; Salvagiotti et al., 2008). A largo plazo, estos balances negativos de N han sido una de las principales causas del agotamiento del N del suelo, estimados localmente con una tasa de pérdida de entre 20-30kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Díaz de Astarloa y Pengue, 2018) durante los últimos 60 años. Por todo esto descripto, surge la necesidad de investigar opciones de manejo a nivel del cultivo y de sistema de cultivo para reponer la fertilidad de N del suelo. En el caso de nutrientes con baja movilidad en el suelo (por ejemplo, fósforo o potasio), aumentar las dosis de fertilizantes para aumentar la disponibilidad de nutrientes en el suelo es una opción factible (Biaassoni et al., 2023; Ciampitti et al., 2011; McCallister et al., 1987; Sucunza et al., 2018). Por el contrario, en el caso del N, un nutriente con alta movilidad en el suelo, y con múltiples mecanismos de pérdida de N (vía emisiones gaseosas, erosión o lixiviación), un excedente de fertilizante nitrogenado que no es tomado por el cultivo, no contribuye a

aumentar los niveles de N del suelo y podría tener impacto negativo en el medio ambiente (Galloway et al., 2008; Picone et al., 2021; Rinski-Korsakov et al., 2004). Por lo tanto, la inclusión de leguminosas de invierno (como cultivos de cobertura o de grano) surge como una opción económica y ecológica para reconstituir el N del suelo en estos sistemas de cultivo a través de la fijación biológica de N (Palmero et al., 2022; Pinto et al., 2021).

Tradicionalmente, el trigo ha sido el cultivo típico de invierno en la región pampeana, pero en los últimos años se ha producido un notable aumento de los cultivos alternativos de invierno/primavera, como la arveja como cultivo de grano, y vicia (*Vicia villosa* Roth.) como cultivo de cobertura. Este aumento de los cultivos de invierno se debió a los múltiples beneficios de la intensificación sustentable de la agricultura mediante el doble cultivo, que permite aumentar los aportes de residuos al suelo, controlar malezas y proporcionar N cuando se utilizan leguminosas. Una leguminosa realiza una contribución positiva de N al sistema (es decir, un balance parcial positivo) cuando los aportes de N derivados de FBN son superiores a las extracciones de N en granos, entonces, dependiendo si la leguminosa se cultiva para la producción de grano o como cultivo de cobertura tendrá un impacto clave en la contribución neta de N al agroecosistema. Un estudio reciente ha cuantificado que aproximadamente el 60 % de la absorción de N proviene de la FBN en ambos cultivos, pero mientras que en vicia alcanzó un balance parcial positivo de 99 kg N ha⁻¹ al sistema, el cultivo de arveja mostró valores cercanos a la neutralidad luego de restar el N exportado con los granos (Enrico et al., 2020). Estos autores también observaron una relación positiva entre la producción de biomasa aérea y FBN, sugiriendo que las estrategias de manejo que mejoren el crecimiento en ambos cultivos aumentarán la FBN y por ende se produciría un simultáneo aumento en el balance parcial de N. En el cultivo de arveja, estudios previos han demostrado que la producción de biomasa y la absorción de N se ven afectadas por la fecha de siembra (O'Connor et al., 1993). Por lo tanto, se esperan cambios en la contribución de la fijación biológica de N en respuesta a cambios en la producción de biomasa como se observó en varios cultivos de leguminosas (Herridge et al., 2008). Sin embargo, en el norte de la región pampeana, dado que existe una ventana estrecha para la siembra de este cultivo (de julio a agosto), la evaluación de genotipos con diferente morfología de planta (foliosa y semiáfila) podría brindar un escenario para incrementar la producción de biomasa y, por lo tanto, un aumento en la cantidad de N proveniente de FBN. Armstrong et al., (1994b) demostraron que genotipos foliosos generan mayor biomasa que los genotipos semiáfilos. Asimismo, Armstrong et al., (1994a) mostraron disminuciones en la biomasa y en el índice de cosecha de N en genotipos foliosos, que afectaron a la absorción de N y a la extracción de N con los

granos. Por el contrario, existe poca variación genotípica en vicia, ya que la mejora genética de este cultivo ha sido limitada (Renzi et al., 2020). Sin embargo, la vicia puede sembrarse en un amplio rango de fechas (desde finales de marzo hasta finales de agosto), dependiendo de la fecha de cosecha del cultivo anterior, la disponibilidad de agua en el momento de la siembra y la fecha de siembra del siguiente cultivo de grano en la rotación. Como cultivo de cobertura, el momento en que se decide detener el crecimiento de la vicia (normalmente alrededor de la plena floración) determinará la acumulación de biomasa. Además, retrasar la fecha de siembra puede reducir el periodo de crecimiento y exponerla a diferentes condiciones ambientales. Entonces, seleccionar la fecha de siembra más adecuada y determinar la duración del periodo de crecimiento, puede ser una posible estrategia de manejo del cultivo que permita mejorar el crecimiento y la FBN en este cultivo.

Estimaciones más precisas de la contribución de la FBN al sistema requiere mediciones exactas de la biomasa y de la absorción de N en las estructuras subsuperficiales, y pocos estudios han abordado esta cuestión en condiciones de campo. En su lugar, algunos informes han estimado el papel relativo de las estructuras subsuperficiales basándose en mediciones de biomasa aérea, y en una proporción fija de biomasa subsuperficial, y contenido de N relativo al N de la biomasa aérea o total (Evans et al., 2001; Palmero et al., 2022; Walley et al., 2007). Como se mencionó en el capítulo 2, en soja, se demostró un efecto significativo del N subsuperficial derivado de la FBN al estimar los balances parciales de N, incluso cuando las raíces representaban menos del 10 % de la biomasa total.

En este capítulo, se probarán las siguientes hipótesis:

Hipótesis 3.1 (asociada al **objetivo 3.1**): Independientemente de la morfología foliar de los genotipos que pueden producir diferente biomasa, el balance parcial de N en arveja es siempre positivo.

Hipótesis 3.2 (asociada al **objetivo 3.2**): El balance parcial de N en vicia disminuirá al retrasar la fecha de siembra asociado a una reducción del crecimiento y de la FBN.

Hipótesis 3.3 (asociada al **objetivo 3.3**): La inclusión del N derivado de la FBN de las estructuras subsuperficiales mejorará significativamente la estimación de los balances parciales de N de arveja como cultivo de grano y vicia como cultivo de cobertura.

Los objetivos de este estudio fueron estimar la biomasa, la absorción de N y la FBN en:

Objetivo 3.1. Estimar la biomasa, la absorción de N y la FBN en genotipos de arveja contrastantes en estructuras foliares e índice de cosecha.

Objetivo 3.2. Estimar la biomasa, la absorción de N y la FBN en vicia en diferentes años y fechas de siembra.

Objetivo 3.3. Estudiar el impacto de la inclusión de estructuras subsuperficiales en el balance parcial de N de arveja como cultivo de grano y vicia como cultivo de cobertura

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Lugar y diseño del experimento

Se realizó un estudio en condiciones de campo durante dos años (A) en arveja (2017 y 2018) y vicia (2018 y 2019) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros, Santa Fe, Argentina (32°33'S, 60°51'W). El suelo fue franco limoso Argiudol típico serie Maciel, descripto en el capítulo 2 (sección 2.1.1). El carbono orgánico del horizonte superficial del suelo (0-20 cm) (Walkley & Black), la concentración de nitratos (Bremner 1965), el fósforo extractable (P-Bray-1, Bray y Kurtz, 1945) y el pH del suelo se detallan en la Tabla 3.1. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de siembra directa y en secano.

Tabla 3.1. Carbono orgánico del suelo (COS), nitrógeno (N-NO₃), fósforo extractable (P-Bray-1, Bray y Kurtz, 1945) y pH en el horizonte superficial de 0,20 m en el lugar de estudio utilizado para los experimentos de arveja y vicia.

Cultivo	Año	COS g kg ⁻¹	N-NO ₃ mg kg ⁻¹	P Bray 1 mg kg ⁻¹	pH (1:2,5)
Arveja	2017	11,7	26,0	20,0	5,7
	2018	11,8	14,8	16,2	5,8
Vicia	2018	13,1	65,0	25,0	5,8
	2019	14,6	13,9	13,0	6,0

En arveja, los tratamientos consistieron en dos cultivares con diferente morfología foliar: i) un cultivar semiáfilo (Viper) y ii) un cultivar folioso (Facon). El cultivo de arveja se sembró el 24 de julio de 2017 y el 10 de julio de 2018, a una profundidad de 4 cm con el objetivo de obtener una población de 90 plantas m², densidad recomendada para esta fecha de siembra. Según el poder germinativo de las semillas, las dosis de siembra fueron de 200 y 245 kg semilla ha⁻¹ para Viper y Facón, respectivamente.

En vicia, se realizaron dos experimentos para comparar: las diferencias entre años (Experimento 1) y las diferencias entre fechas de siembra (FS) (Experimento 2).

Los tratamientos del experimento 1 consistieron en comparar una fecha de siembra similar en dos años diferentes (15 de junio en 2018, y 10 de junio en 2019). El experimento 2 comparó tres fechas de siembra contrastantes en 2019 (10 de junio, temprana; 5 de julio, intermedia, y 15 de agosto, tardía). Ambos experimentos se sembraron a una densidad de aproximadamente 60 kg de semillas ha⁻¹, a 4 cm de profundidad. Todas las semillas fueron inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* var *viceae* inoculada inmediatamente antes de la siembra (5 ml kg⁻¹ semilla) y tratadas con fungicida MAXIM® XL. En 2017, la arveja se sembró después del doble cultivo de trigo/soja y en 2018 después de la soja de primera. Del mismo modo, la vicia se sembró después de la soja de primera en ambos años.

En ambos cultivos, el diseño experimental fue un bloque completo aleatorizado con 3 repeticiones. En la siembra se fertilizó con 9 y 16 kg P ha⁻¹ en arveja y vicia respectivamente. El tamaño de las parcelas fue de 10 m de largo y 5,6 m de ancho, con hileras a 0,20 m. Las malezas, enfermedades y plagas se controlaron químicamente siempre que fue necesario durante la temporada, siguiendo las prácticas agronómicas locales.

3.2.2 Muestreo de plantas

El muestreo de la biomasa aérea y subsuperficial se realizó en el estadio fenológico de vaina plana (Knott, 1987) en arveja y en plena floración (más del 50% de las plantas con flores visibles) en vicia, y en madurez fisiológica en ambos cultivos. Aun cuando el cultivo de vicia se utiliza normalmente como cultivo de cobertura y se hace un secado químico alrededor de plena floración, también se evaluó la producción de biomasa hasta el final del ciclo (75% de las plantas con la primera vaina descolorida y seca, hoja senescente (Renzi y Cantamutto, 2013), para determinar la máxima contribución de biomasa y absorción de N.

En arveja, la biomasa aérea se separó en hojas, tallos, vainas, carpelos y semillas, dependiendo del momento del muestreo. En vicia, no se separaron las estructuras aéreas. La extracción y procesamiento de biomasa subsuperficial se realizó de forma similar a la detallada en el capítulo anterior en soja (sección 2.2.2), extrayendo bloques de suelo sin disturbar de 0,52 m de ancho, 0,35 m de largo y 30 cm de profundidad. Se extrajo un bloque de suelo inalterado de cada unidad experimental y en cada estadio fenológico muestreado. La profundidad de muestreo de la biomasa subsuperficial se determinó basándose en estudios previos que demuestran que el 50% de la biomasa radical de arveja y leguminosas se encuentra a aproximadamente 0,18 m y 0,15 m de profundidad, respectivamente (Fan et al., 2016), y que entre el 66% y el

97% de la biomasa radical de arveja está presente en los 0,23 m superiores (Armstrong et al., 1994b; Benjamin y Nielsen, 2006). Por lo tanto, ésta profundidad de muestreo de 30 cm incluye la recuperación física de la mayor parte de la biomasa de raíces y nódulos de los cultivos (de aquí en adelante, biomasa subsuperficial). También estimamos la contribución de todo el sistema radical hasta 1,1 m de profundidad, considerando que nuestra determinación hasta 30 cm de profundidad puede representar el 67 y el 70% de toda la biomasa subsuperficial de arvejas y legumbres, respectivamente (Fan et al., 2016).

En madurez fisiológica de arveja, se cosechó una porción central de la parcela (1,4 m de ancho x 8 m de largo), y se calculó el índice de cosecha como la relación entre la biomasa de granos y la biomasa aérea (IC_{BA}) y la biomasa total (aérea + subsuperficial) (IC_{BT}). El rendimiento de grano se ajustó a un contenido de humedad estándar de 13,5%.

3.2.3 Absorción de nitrógeno y fijación biológica del nitrógeno

La biomasa aérea (BA) y subsuperficial (BS) se molió hasta obtener un polvo fino (malla de 0,5 mm) con una trituradora FOSS Cyclotec™ T193 (FOSS NIRSystems, Inc., Hillerød, DK). La concentración total de N (%N) y el análisis de abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}N\text{‰}$) se determinaron en espectrómetro de masas (Tabla 3.7 y Tabla 3.8, anexo). La absorción de nitrógeno se calculó como el producto del %N en cada estructura y su biomasa respectiva. En arveja, la absorción de N en biomasa vegetativa aérea (N-BA) en el estadio de vainas planas se calculó como la suma de la absorción de N en tallos, hojas y vainas, y en la madurez fisiológica como la suma de tallos, hojas y carpelos. En la madurez fisiológica, también se cuantificó la absorción de N en semilla (N semilla). La absorción total de N de arveja (N-Tot) se calculó como la suma del N vegetativo aéreo y el N en la biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (N-BS) en el estadio de vaina plana, y se incluyó el N de la semilla para la absorción total de N en madurez fisiológica. El índice de cosecha de nitrógeno se calculó como la relación entre el N de la semilla y el N de la biomasa aérea y N de biomasa total (ICN_{BA} y ICN_{BT}). De forma similar, la absorción de N en vicia se cuantificó en biomasa aérea (N-BA) y biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (N-BS) en plena floración y madurez fisiológica. La absorción total de N en vicia (N-Tot) se calculó como la suma del N aéreo y subsuperficial.

El porcentaje de fijación biológica de N (%Ndfa) se determinó al igual que en soja (sección 2.2.3) mediante el método de la abundancia natural de ^{15}N (Shearer y Kohl, 1986):

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N_{referencia} - \delta^{15}N_{Leguminosa}}{\delta^{15}N_{referencia} - B} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde el valor B es $\delta^{15}N$ considerando toda la planta (incluyendo las estructuras subsuperficiales) de arveja o vicia totalmente dependiente de la fijación de N_2 que crecieron en invernadero, y los resultados fueron - 0,63 y - 0,33 para Facon y cv. Viper, respectivamente, y -0,39 para vicia (Enrico et al., 2020); $\delta^{15}N_{ref}$ es la abundancia natural de ^{15}N en un cultivo no fijador que sólo depende del N del suelo creciendo en las mismas condiciones y $\delta^{15}N_{Leguminosa}$ es la abundancia natural de ^{15}N de arveja o vicia (Tablas 3.7 y 3.8 Anexo). Para calcular el %Ndfa se utilizó un $\delta^{15}N$ ponderado para todas las estructuras (es decir, suma de tallos, hojas, carpelos, raíces y nódulos, y semilla en función del estadio fenológico) (Unkovich et al., 2008). Se utilizó como referencia un cultivo de trigo que no recibió fertilización nitrogenada en cada tratamiento. Éste cultivo de referencia se sembró al lado de cada unidad experimental y en la misma fecha de siembra.

El porcentaje de fijación biológica se utilizó para calcular la cantidad de FBN a partir de la absorción de N acumulado entre dos estadios (es decir, de emergencia a vaina plana/plena floración y de vaina plana/plena floración a madurez fisiológica). La FBN total (FBN-Tot) se calculó como la suma de acumulaciones parciales entre los estadios fenológicos muestreados (Herridge et al., 1990). Al igual que lo calculado en soja, se asumió una proporción similar de %Ndfa, entre las diferentes estructuras (Carranca et al., 2015; Rymuza et al., 2020). Por lo tanto, se utilizó la proporción de FBN total estimada para calcular la FBN-N vegetativa aérea ($N_{FBNBA_{veg}}$), la FBN-N en biomasa subsuperficial (N_{FBNBS}) y la FBN de semilla ($Sem N_{FBN}$) para cada cultivo según el estado fenológico analizado.

Se calculó un balance parcial de N para arveja y vicia, como las entradas de FBN menos el N exportado en granos (sólo arveja), teniendo en cuenta FBN aérea (BP_{BA}) y la FBN total que incluía las estructuras subsuperficiales (BP_{BT}).

$$BP_{BA} = N_{FBNBA} - N_{semilla} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$BP_{BT} = N_{FBNBT} - N_{semilla} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

3.2.4 Análisis de datos

Los datos se analizaron en cada cultivo mediante un análisis de varianza utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2011). En arveja, se evaluaron los efectos

del año (A) y de los cultivares (C) sobre todas las variables medidas. Para comprobar los efectos de año, se utilizó la repetición dentro del año como término de error (Gómez y Gómez 1984). En vicia, los datos se analizaron mediante ANOVA para los experimentos 1 y 2. Cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas, se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) con un valor $p < 0,05$ (indicado como números en negrita en todas las Tablas). En ambos cultivos, las diferencias entre BP_{BA} y BP_{BT} se compararon mediante una prueba t pareada. Las comparaciones de pendientes y ordenadas al origen se realizaron mediante test T-student utilizando el programa GraphPad Prism 6.01.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Condiciones meteorológicas

En 2017 la temperatura media y las precipitaciones durante el periodo de crecimiento de arveja fueron 17 °C y 292 mm, respectivamente, similar a los registros históricos (Figura 3.1). En 2018, la temperatura mínima y la precipitación acumulada durante el periodo desde la emergencia hasta vaina plana en arveja y floración en la vicia fueron 14 % y 38 % inferiores a los registros históricos. Desde el estadio de vaina plana en arveja, y plena floración en vicia hasta madurez fisiológica, las precipitaciones aumentaron aproximadamente un 60% respecto a la media histórica en ambos cultivos. En 2019, las precipitaciones acumuladas de junio a agosto fueron un 23% inferiores al registro medio histórico, pero de septiembre a diciembre fueron un 11% superiores a la media histórica. La temperatura media en 2019 fue similar a los registros históricos.

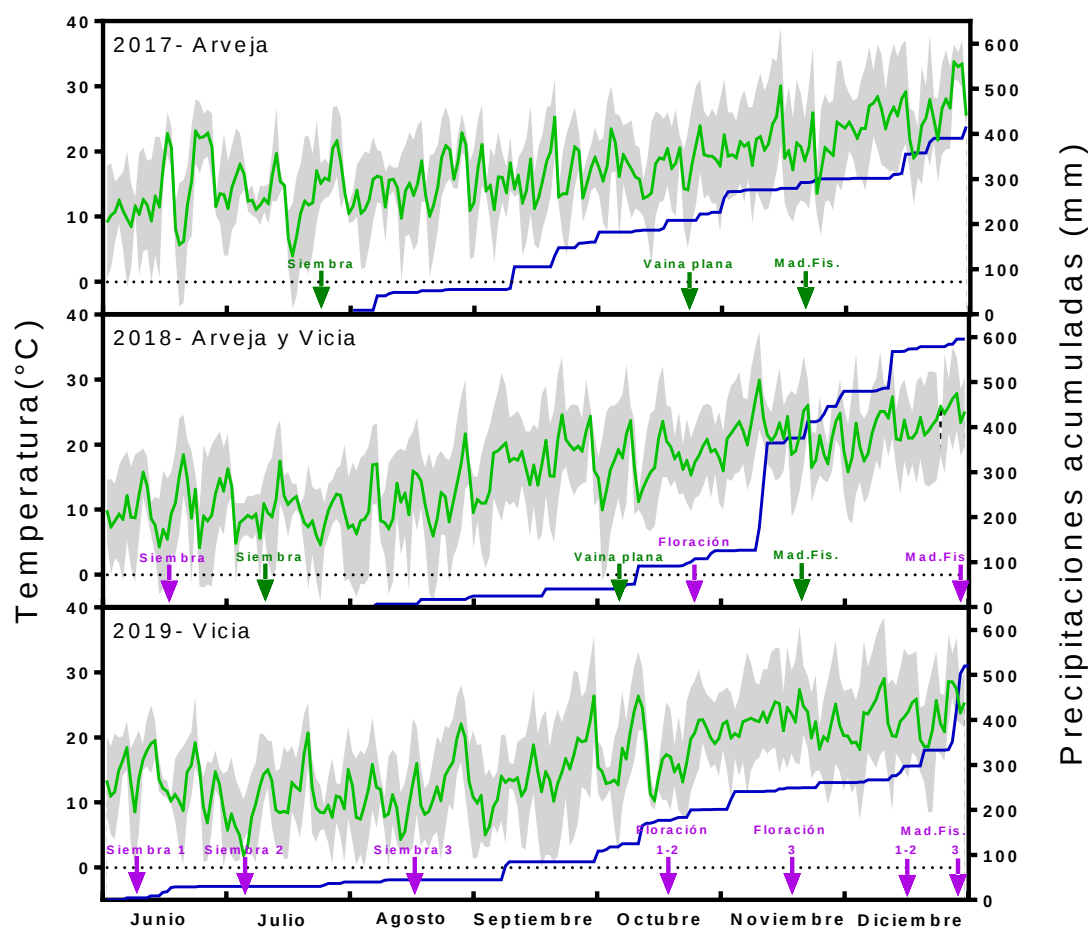


Figura 3.1. Condiciones climáticas en las campañas agrícolas 2017, 2018 y 2019 en la zona de estudio de región Pampeana Norte, Argentina. La línea verde y el área sombreada representan el rango de temperatura media, máxima y mínima del aire, respectivamente (eje “y” izquierdo). La línea escalonada (azul) representa la precipitación acumulada para cada año (eje “y” derecho). Las flechas verde y violeta representan el momento de la siembra, el estadio de vaina plana/floración completa y la madurez fisiológica para arveja y vicia, respectivamente. Los números de las flechas violeta para la temporada 2019 indican la época de siembra temprana (1), intermedia (2) y tardía (3).

3.3.2 Arveja

3.3.2.1 Rendimiento y producción de biomasa

En arveja el rendimiento de grano fue similar entre años. En promedio, Facon produjo 2090 kg ha⁻¹, superando a Viper en un 56% (1344 kg ha⁻¹) (Tabla 3.2). En el

estadio de vaina plana, la biomasa total alcanzó una media de 3698 kg ha⁻¹, sin diferencias significativas entre años o cultivares (Tabla 3.2). Al analizar la biomasa aérea, se observó una interacción significativa año x cultivar ($P < 0,05$), donde Facon fue 26% mayor y 20% menor que Viper en 2017 y 2018, respectivamente. La biomasa subsuperficial fue 1,8 veces mayor en 2018 que en 2017 (880 y 468 kg ha⁻¹, respectivamente), y representó el 12 y el 25% de la biomasa total, respectivamente (Tabla 3.2).

La biomasa total en madurez fisiológica promedio 4838 kg ha⁻¹, sin efectos significativos de los tratamientos (Tabla 3.2). La biomasa subsuperficial representó el 5% de la biomasa total (233 kg ha⁻¹). A pesar de la ausencia de diferencias en la biomasa total, el IC mostró diferencias significativas entre genotipos: Facon IC_{BT} y IC_{BA} fueron un 56% superiores a Viper (Tabla 3.2). Promediando ambos genotipos, el IC fue del 0,33 y del 0,31 cuando se consideró sólo la biomasa aérea o total respectivamente.

Tabla 3.2. Biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), biomasa aérea (BA), biomasa total (Tot = BS+BA) en vaina plana y madurez fisiológica, y rendimiento ajustado a un contenido de humedad estándar de 13,5% en arveja, según el efecto de dos cultivares diferentes (C) (Facon y Viper) durante dos años (A). También se muestra el índice de cosecha considerando la biomasa total (IC_{BT}) y sólo la biomasa aérea (IC_{BA}). Se muestran las medias, el error estándar (E.E) y los valores p del ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales A y C. El lugar de estudio fue la región pampeana norte de Argentina.

Cultivares	Vaina plana			Madurez fisiológica			Rendimiento	IC _{BT}	IC _{AB}
	BA	BS	Tot	BA	BS	Tot			
kg ha ⁻¹									
2017									
FACON	3706	460	4166	5318	197	5515	2178	0,35	0,36
VIPER	2952	475	3427	4323	230	4553	1407	0,27	0,28
2018									
FACON	2411	962	3373	3939	283	4222	2002	0,41	0,44
VIPER	3025	799	3824	4839	222	5061	1281	0,22	0,24
E.E.	249	82	279	689	26	702	172	0,02	0,03
p-valor									
A	< 0,05	< 0,01	0,27	0,46	0,61	0,46	0,17	0,50	0,44
C	0,79	0,41	0,63	0,95	0,61	0,93	< 0,05	<0,01	<0,01
A x C	< 0,05	0,34	0,10	0,24	0,14	0,27	0,89	0,08	0,07

3.3.2.2. Absorción de N y FBN

La absorción total de N en el estadio de vaina plana fue en promedio 102 kg N ha⁻¹, y no se observaron efectos del año o del genotipo (Tabla 3.3). El N de biomasa subsuperficial representó el 5% del N absorbido total en 2017 y el 15% en 2018. La proporción de N derivado de FBN promedió 45% (Tabla 3), y no se vio afectada por cultivares y años. Sin embargo, la FBN total mostró una interacción significativa año x cultivar. En 2017, la FBN total en Facon fue 54 kg N ha⁻¹, superando a Viper en un 58%, pero en 2018 Facon mostró valores de FBN total un 35% inferiores a Viper. El N proveniente de FBN subsuperficial fue 2 y 7 kg N ha⁻¹ en 2017 y 2018, respectivamente (Tabla 3.3), y representó el 5% del N total absorbido en el estadio de vaina plana.

En madurez fisiológica, la absorción total de N promedió 130 kg N ha⁻¹ y no se encontraron diferencias atribuibles al año o cultivar (Tabla 3.3). El contenido promedio de N en la semilla fue de 63 kg N ha⁻¹, y representó aproximadamente la mitad de la absorción total de N, con claras diferencias entre cultivares, ya que Facon acumuló 75 kg N ha⁻¹, un 45% más que Viper. Por lo tanto, el ICN_{BT} mostró mayores diferencias entre cultivares, y fue del 56% en Facon y del 42% en Viper (Tabla 3.3). El N subsuperficial, representó el 2% del N total, y fue un 76% mayor en 2018 respecto a 2017. La absorción de nitrógeno en estructuras subsuperficiales en madurez fisiológica representó el 32% del N acumulado en el estadio de vaina plana.

Tabla 3.3. Absorción de N (N) y N de fijación biológica (FBN) en la biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), biomasa vegetativa aérea (BA), biomasa total (Tot), y Semilla en estadios de vaina plana y madurez fisiológica según el efecto de dos cultivares diferentes (C) durante dos años (A) en arveja. También se presenta la proporción de N derivado de la fijación biológica del N (% Ndfa). Se muestran las medias, los errores estándar (E.E.) y los p-valor de ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales A y C. El sitio de estudio fue la región pampeana norte de Argentina.

Cultivares	Vaina plana							Madurez fisiológica											
	N absorbido			FBN				Ndfa	N absorbido				FBN				Ndfa	ICN _{BT}	ICN _{BA}
	N-BA _{Veg}	N-BS	N-BT	N _{FBN} BA _{Veg}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT	N-BA _{Veg}		Sem N	N-BS	N-BT	N _{FBN} BA _{Veg}	Sem N _{FBN}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT				
	kg N ha ⁻¹								kg N ha ⁻¹							%			
2017																			
FACON	120	8	128	51	3,3	54	42	69	81	2,1	153	30	36	0,9	67	44	0,53	0,54	
VIPER	83	4	87	33	1,5	34	39	55	51	1,9	108	21	19	0,8	41	38	0,47	0,48	
2018																			
FACON	77	16	93	32	6,1	38	41	46	68	3,6	118	19	27	1,5	47	40	0,58	0,60	
VIPER	89	13	101	51	7,7	59	58	85	53	3,4	141	42	25	1,5	69	49	0,37	0,38	
E.E.	11,8	1,3	12,3	2,8	0,54	3,0	6,0	12,2	7,7	0,91	19,9	4,7	3,6	0,34	8,8	4,3	0,03	0,03	
p-valor																			
A	<0,05	<0,001	0,20	1,00	0,05	0,75	0,54	0,79	0,18	<0,05	0,97	0,56	0,79	0,10	0,76	0,73	0,58	0,69	
C	0,34	<0,05	0,26	0,86	0,77	0,92	0,28	0,37	<0,05	0,83	0,62	0,28	0,06	0,83	0,80	0,43	<0,01	<0,01	
A x C	0,11	0,56	0,11	<0,01	<0,05	<0,01	0,15	0,09	0,39	0,96	0,16	0,05	0,10	0,78	0,05	0,08	<0,05	<0,05	

La absorción total de N estimada como la inversa de la pendiente de la relación entre N absorbido y; biomasa o rendimiento, fue de 27,5 kg N por Mg de biomasa ($Y=36,4 X$, Figura 3.2 a) y 75 kg N por Mg de grano (Figura 3.2 b).

En madurez fisiológica, el %Ndfa, promedió 43% sin diferencias entre años o cultivares (Tabla 3.3). Sin embargo, se observó una interacción significativa año x cultivar para N total proveniente de FBN, donde Facon fue un 65% mayor que Viper en 2017, pero un 33% menor en 2018. El N de FBN de la semilla fue de 32 y 22 kg N ha⁻¹ para Facon y Viper, respectivamente, representando el 56 y el 42% del N total proveniente de fijación biológica, respectivamente. La fijación biológica de N en las estructuras subsuperficiales representó solo el 1% de la absorción total de N.

3.3.3 *Vicia*

3.3.3.1 *Biomasa*

En el experimento 1, el tiempo transcurrido desde la siembra hasta plena floración fue de aproximadamente 133 días en ambos años, pero el período desde la siembra hasta la madurez fisiológica fue 12 días más largo en 2018 respecto de 2019 (Figura 3.1). En el experimento 2, el estadio de plena floración se alcanzó 133, 108 y 96 días después de la siembra, para las fechas de siembra temprana, intermedia y tardía, respectivamente (Figura 3.1). El período entre la plena floración y la madurez fisiológica fue de 56 días en la fecha de siembra temprana e intermedia, y de 38 días para la fecha de siembra tardía (Figura 3.1).

En el experimento 1, la biomasa total en plena floración promedió 9460 kg ha⁻¹ en 2019, 57% superior a la obtenida en 2018, con una biomasa subsuperficial similar en ambos años (1007 kg ha⁻¹), que representó el 13% de la biomasa total.

En el experimento 2, en plena floración, la biomasa total varió entre 7200 y 9460 kg ha⁻¹ (Tabla 3.4). La biomasa total en plena floración en la fecha de siembra temprana fue 31% superior a la fecha de siembra tardía. La biomasa subsuperficial en las fechas de siembra temprana e intermedia fue 84 y 57% superior a la observada en la fecha de siembra tardía (611 kg ha⁻¹).

En madurez fisiológica, en el experimento 1 la biomasa total de 2019 fue un 69% superior a la observada en 2018 (Tabla 3.4), mostrando valores similares de biomasa subsuperficial (285 kg ha⁻¹).

En el experimento 2 todas las fechas de siembra alcanzaron una biomasa total similar, con un promedio de 12909 kg ha⁻¹. La biomasa subsuperficial alcanzó una media de 366 kg ha⁻¹, con el valor máximo en las fechas de siembra intermedias (593 kg ha⁻¹)

y mínimo en la fecha de siembra tardía (175 kg ha⁻¹). Se registró una caída de 32 kg ha⁻¹ en la biomasa total en plena floración por cada día de retraso en la fecha de siembra (Tabla 3.4) ($Y = -31,68 X + 9349$, $r^2 = 0,78$), sin embargo, al analizar la biomasa total en la madurez fisiológica, no se observaron cambios por el retraso en la fecha de siembra (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Biomasa aérea (BA), biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), y biomasa total (Tot= BA+BS) (kg ha⁻¹), en plena floración y madurez fisiológica en vicia, según se vean afectadas por; año (A) en una sola fecha de siembra (Experimento 1), y diferentes fechas de siembra (FS) en un solo año (Experimento 2). Se muestran las medias, los errores estándar (E.E.) y los p-valor del ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales A y FS. El lugar de estudio fue la región pampeana norte de Argentina.

Tratamientos	Plena floración			Madurez fisiológica		
	BA	BS	Tot	BA	BS	Tot
kg ha ⁻¹						
Experimento 1						
2018	5145	892	6037	7451	241	7691
2019	8341	1122	9463	12665	328	12993
S,E,	411	78	440	384	52	339
p-valor						
A	< 0,01	0,1	<0,01	<0,01	0,5	<0,01
Experimento 2						
Temprana	8341	1122	9463	12665	328	12993
Intermedia	6670	960	7630	11804	593	12397
Tardía	6605	611	7216	13163	175	13338
E,E,	658	87	675	706	106	690
p-valor						
FS	0,18	<0,05	0,12	0,4	0,08	0,64

3.3.3.2. Absorción de N y FBN

En el experimento 1, la absorción total de N en plena floración fue 249 kg N ha⁻¹ en 2019, 75 % mayor respecto 2018. Mientras que, el N derivado de FBN promedió 51 kg N ha⁻¹ y representó el 40 y el 18 % de la absorción total de N en 2018 y 2019, respectivamente (Tabla 3.5). Para ambos tratamientos el N de FBN subsuperficial

promedió 6 kg N ha⁻¹ y representó el 12 % de la FBN total y el 4 % de la absorción total de N.

En el experimento 2, no se encontraron diferencias en la absorción total de N en plena floración entre las tres fechas de siembra (Tabla 3.5). El N subsuperficial representó el 11% de la absorción total de N en las fechas de siembra temprana e intermedia y el 8% en la fecha de siembra tardía. El nitrógeno derivado de la FBN fue 2,4 y 1,4 veces mayor para las fechas de siembra tardía e intermedia en comparación con la siembra temprana, indicando un incremento en el N de FBN de 46 hasta 157 kg N ha⁻¹ al retrasar la fecha de siembra, lo que en términos relativos representó un incremento de 18 a 78% del %Ndfa (Tabla 3.5). La FBN subsuperficial promedio entre las tres fechas de siembra 9 kg N ha⁻¹, representando el 10% de la fijación biológica total de N, pero las fechas de siembra intermedia y tardía duplicaron la contribución neta de la fecha de siembra temprana (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Absorción de N (N) y N de fijación biológica (FBN) en la biomasa subsuperficial a 30 cm de profundidad (BS), biomasa aérea (BA), y biomasa total (BT) en estadíos de plena floración y madurez fisiológica en vicia según; año (A) en una sola fecha de siembra (Experimento 1), y diferentes fechas de siembra (FS) en un solo año (Experimento 2). También se presenta la proporción de N derivado de la fijación biológica de N (% Ndfa). Se muestran las medias, los errores estándar (E.E.) y los p-valor del ANOVA (valores significativos en negrita) para los efectos principales A y FS. El sitio de estudio fue la región pampeana norte de Argentina.

Tratamientos	Plena Floración							Madurez fisiológica							
	N absorbido			FBN			Ndfa	N absorbido			FBN			Ndfa	
	N-BA _{Veg}	N-BS	N-BT	N _{FBN} BA _{Veg}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT		N-BA _{Veg}	N-BS	N-BT	N _{FBN} BA _{Veg}	N _{FBN} BS	N _{FBN} BT		
				kg ha ⁻¹				%				kg ha ⁻¹			
Experimento 1															
2018	122	20	142	49	8,1	57	40	192	4,6	197	59	1,4	60	31	
2019	222	27	249	41	4,53	932	46	363	7,9	371	90	1,9	92	25	
E.E	6,6	2,1	5,5	12,4	1,2	13,6	5,8	2,9	1,2	3,2	9,0	0,2	9,0	3,2	
p-valor															
A	<0,001	0,09	<0,001	0,67	0,08	0,6	0,06	<0,0001	0,11	<0,0001	0,07	0,12	0,07	0,27	
Experimento 2															
Temprana	222	27	249	41	4,5	46	18	363	7,9	371	90	1,9	92	25	
Intermedia	178	23	201	96	12,5	109	54	316	14,6	330	176	8,3	184	57	
Tardía	186	15	201	145	11,4	157	76	383	4,0	387	292	3,0	295	76	
E.E	22	2,5	22	26,4	1,5	26,9	7,7	29,2	2,3	28,5	18	1,35	17,3	2,9	
p-valor															
FS	0,39	<0,05	0,28	0,08	<0,05	0,07	<0,01	0,31	<0,05	0,41	<0,001	<0,05	<0,001	<0,0001	

En el experimento 1, la absorción total de N en la madurez fisiológica fue de 371 kg N ha⁻¹ en 2019, 88 % mayor respecto 2018 (Tabla 3.5). El N subsuperficial representó el 2 % de la absorción total de N en ambos años.

En el experimento 2, la absorción total de N en la madurez fisiológica fue en promedio 363 kg N ha⁻¹ (Tabla 3.5). El N subsuperficial representó aproximadamente el 2,5% de la absorción total de N, promediando 9 kg N ha⁻¹ para todos los tratamientos, que significó una reducción de 60% en relación con el N subsuperficial observado en plena floración (Tabla 3.5). La biomasa total se relacionó positivamente con la absorción total de N, indicando requerimientos de 27,9 kg N por Mg de biomasa ($Y=35,7 X$) (Figura 3.2 a).

En madurez fisiológica, se observaron diferencias significativas en el experimento 2 entre las fechas de siembra en %Ndfa y N de FBN total, incrementándose de 25 a 76% y de 92 a 295 kg N ha⁻¹ de la fecha de siembra temprana a la tardía (Tabla 3.5). Promediando todas las FS, la contribución de N de FBN de las estructuras subsuperficiales en madurez fisiológica disminuyeron 53% respecto a la observada en plena floración, alcanzando en madurez fisiológica 4 kg N ha⁻¹, que representó el 2,3% del N de FBN total (Tabla 3.5).

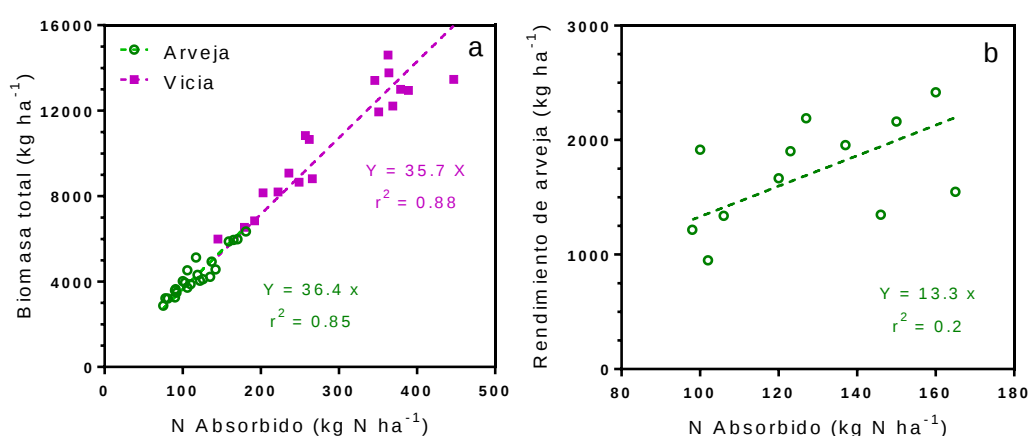


Figura 3.2. Relación entre a) la biomasa total (incluida la biomasa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad) y la absorción de N para arveja (círculos verdes) y vicia (experimento 2 - cuadrados violeta), y b) la producción de semilla de arveja (ajustada a un contenido de humedad de 13,5%) y la absorción de N. Las líneas discontinuas de las figuras a y b representan la regresión lineal. Ambos cultivos se cultivaron en condiciones de campo en la región pampeana norte de Argentina.

3.3.4 Balance parcial de N de arveja y vicia

El balance parcial de N en arveja promedió -13 y -4 kg N ha⁻¹ en 2017 y 2018, respectivamente, cuando se consideró solo el N de FBN aéreo. Cuando se incluyó el N de FBN subsuperficial, el balance parcial aumentó significativamente a -12 y -2 kg N ha⁻¹ (p< 0,01), respectivamente (Figura 3.3).

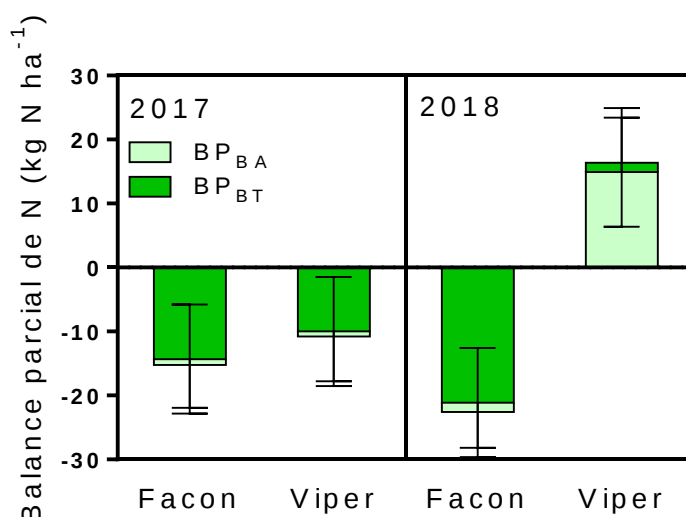


Figura 3.3. Balance parcial de N en dos cultivares arveja: folioso (Facon) y semiáfido (Viper). El balance parcial de N se calculó como la fijación biológica de N menos el N exportado en granos, teniendo en cuenta la fijación biológica de N de estructuras aéreas (BP_{BA}) y añadiendo también la fijación biológica de N de estructuras subsuperficiales cuantificada hasta 30 cm de profundidad (BP_{BT}). Los dos años del experimento de campo se presentan por separado. Las líneas verticales de cada columna representan el error estándar de las medias. El lugar de estudio fue la región pampeana norte de Argentina.

En el cultivo de arveja, se observó un efecto significativo del cultivar respecto al balance de N: el balance parcial de N al incluir el N subsuperficial fue negativo para Facon, promediando -18 kg N ha⁻¹, y positivo para Viper, que promedió 3 kg N ha⁻¹. Considerando estas diferencias, la relación entre %Nd_{fa} y el balance parcial de N total (incluyendo el N de FBN subsuperficial) se analizó por separado para ambos cultivares. De este modo, se observó una relación positiva entre %Nd_{fa} y el balance parcial de N para ambos cultivares, sin diferencias significativas (p= 0,65) entre las pendientes (Figura 3.4, a). Sin embargo, la ordenada al origen de la regresión fue significativamente

afectado por los cultivares ($p < 0,05$). Resolviendo este parámetro de la regresión para $Y=0$, que indica el %Ndfa mínimo necesario para alcanzar un balance parcial de N neutro, los balances neutros se alcanzarían cuando el %Ndfa es superior al 57 y 43% para Facon y Viper, respectivamente, al incluir el N de FBN subsuperficial (Figura 3.4, a). Cuando no se tienen en cuenta las contribuciones de N subsuperficial, este %Ndfa debería ser un 2% superior (59 y 44% respectivamente, datos no mostrados). Independientemente del cultivar, las contribuciones de FBN estuvieron más relacionadas con el balance parcial de N que el N exportado en granos (Figura 3.4 b, y 3.4 c).

El balance parcial de N en arveja considerando la inclusión de N-FBN subsuperficial no demostró relación con el rendimiento de grano alcanzado o la biomasa acumulada (Figura 3.5.b anexo).

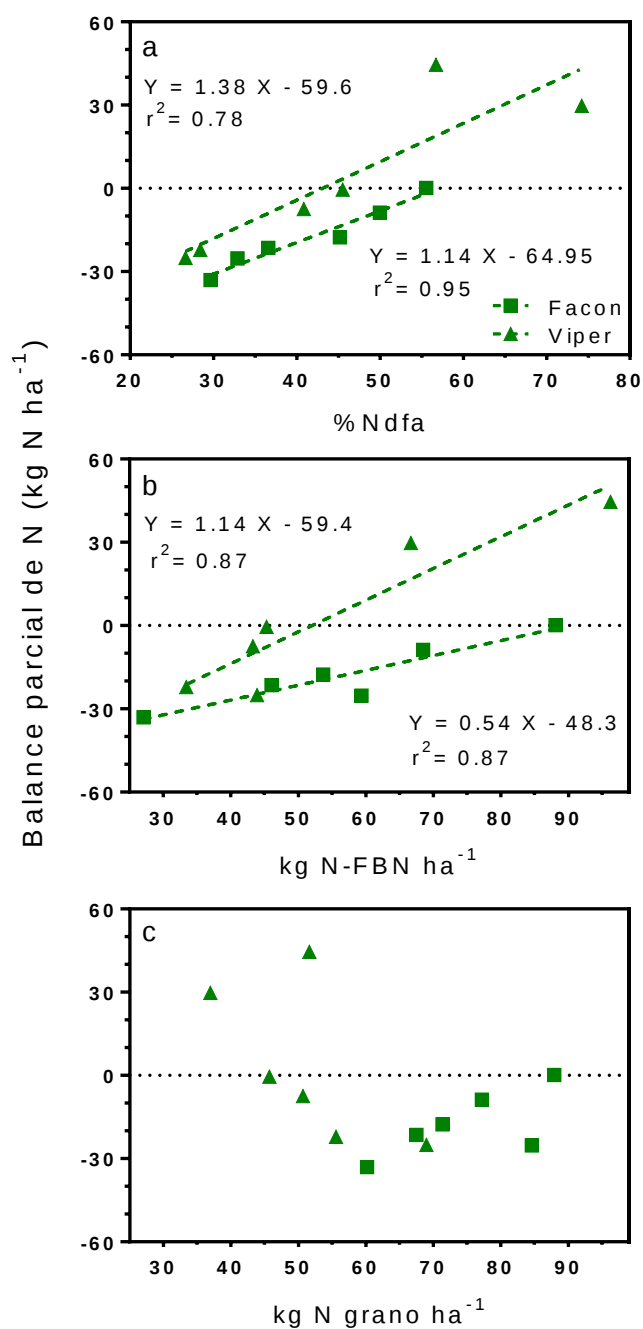


Figura 3.4. Relación entre el balance parcial de N en arveja incluyendo el N subsuperficial a 30 cm de profundidad con a) la proporción de N derivado de la fijación biológica de N (%Ndfa), b) el N derivado de la fijación biológica de N (kg N-FBN ha⁻¹), y c) N de grano (kg N grano ha⁻¹). Los cuadrados y triángulos representan los cultivares Facon y Viper respectivamente. Las líneas discontinuas de las figuras a y b representan la regresión lineal. El sitio de estudio se ubicó en la región Pampeana Norte de Argentina.

Dado que la vicia es un cultivo de cobertura (es decir, no exporta N en granos), el balance parcial de N fue siempre positivo. En el experimento 1, no se observaron diferencias significativas entre años en una fecha de siembra similar para el balance parcial de N cuando se consideraron solo los aportes de FBN de estructuras aéreas, promediando 45 kg N ha^{-1} . Al incluir los aportes de FBN subsuperficial, este balance parcial de N aumentó un 14% (51 kg N ha^{-1}) en ambos años (Figura 3.6, a).

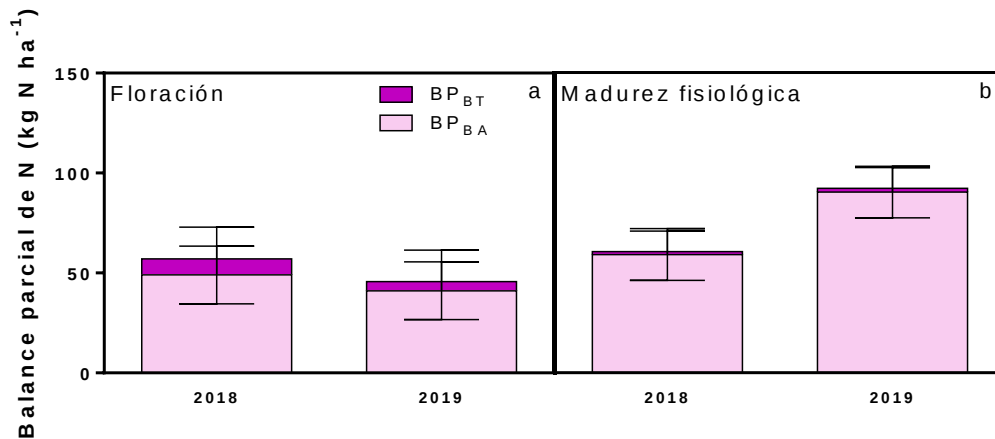


Figura 3.6. Balance parcial de N en vicia, calculado como aportes de fijación biológica de N para dos años en una misma fecha de siembra (Experimento 1 - 15 de junio en 2018, y 10 de junio en 2019), considerando la fijación biológica de N en las estructuras aéreas (BP_{BA}) e incluyendo también los aportes de FBN de las estructuras subsuperficiales (BP_{BT}) hasta 30 cm de profundidad en plena floración (a) y madurez fisiológica (b). Los datos de 2019 también se muestran en la Figura 3.7. El sitio de estudio fue en la región Pampeana Norte de Argentina.

En el experimento 2, al estimar el balance parcial de N en plena floración y considerando todas las fechas de siembra y sólo los aportes de FBN de estructuras aéreas, el balance parcial de N osciló entre 41 y 145 kg N ha^{-1} . Estos valores aumentaron significativamente ($p < 0,0001$) a 46 y 157 kg N ha^{-1} , cuando se incluyó los aportes de FBN subsuperficial (Figura 3.7, a), lo que representa un aumento del 12 y 8% en el balance parcial de N. En 2019, el balance parcial de N en plena floración aumentó a razón de $1,6 \text{ kg N ha}^{-1}$ por día de retraso en la fecha de siembra (Figura 3.7, b).

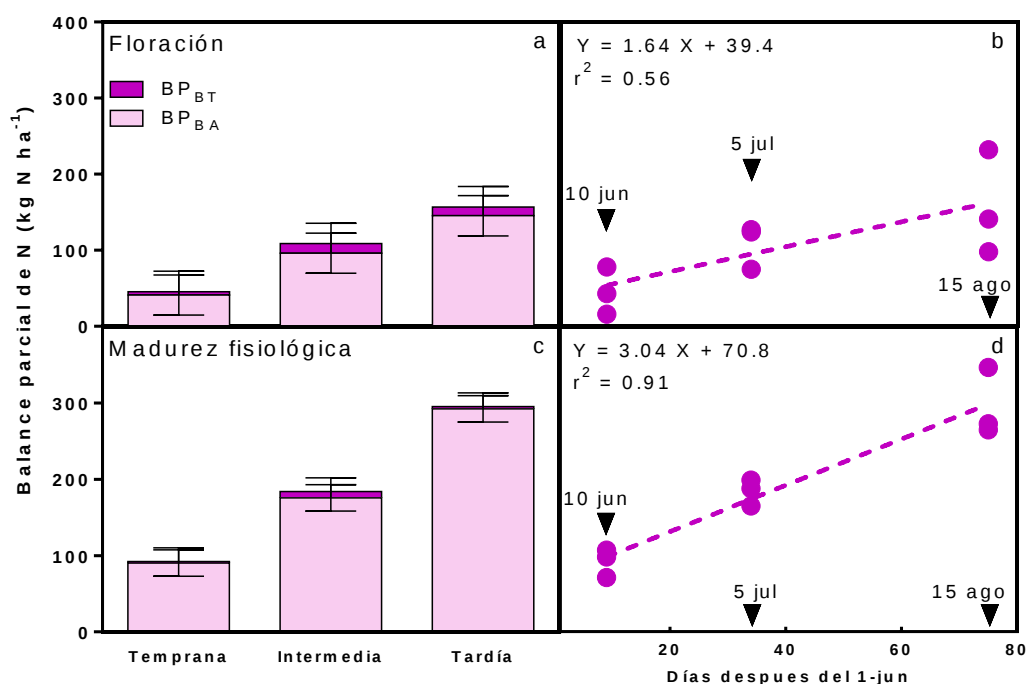


Figura 3.7. Balance parcial de N en vicia, calculado como aportes de fijación biológica de N, a) y c) para tres fechas de siembra (temprana, intermedia y tardía) en un año, teniendo en cuenta a fijación biológica de N en las estructuras aéreas (BP_{BA}) e incluyendo también los aportes de FBN de las estructuras subsuperficiales (BP_{BT}) hasta 30 cm de profundidad en plena floración (a) y madurez fisiológica (c). Las figuras b) y d), muestran los cambios en el balance parcial total en función del retraso de la fecha de siembra. Los segmentos verticales representan el error estándar de las medias. Las líneas discontinuas en las figuras b y d representan la regresión lineal. El sitio de estudio fue en la región Pampeana Norte de Argentina.

En el experimento 1, cuando se incluyó el N de FBN subsuperficial, el balance parcial de N en madurez fisiológica fue de 76 kg N ha⁻¹, incrementándose un 2% respecto al balance parcial de N considerando sólo los aportes de las estructuras aéreas (Figura 3.6, b). Promediando ambos años, el balance parcial aumentó aproximadamente 70 y 54% respecto al estimado en plena floración cuando se considero solo la biomasa aérea, y la biomasa total, respectivamente.

En el experimento 2, el balance parcial de N en madurez fisiológica fue 2 y 1,86 veces mayor que el calculado en plena floración cuando se consideraron aportes de N de FBN aéreos y totales, respectivamente (Figura 3.7, a y c). Cuando se incluyó el N de FBN subsuperficial el balance parcial de N aumentó 3% en promedio para todas las fechas de siembra respecto el balance de biomasa aérea en madurez fisiológica. El balance parcial de N fue diferente cuando se compararon las fechas de siembra en el

experimento 2, incrementándose a una tasa de 3,1 kg N ha⁻¹ por día de retraso en la fecha de siembra (de aprox. 91 a 294) (Figura 3.7, d).

De forma similar a lo observado para arveja, el %Nd_{fa} fue el parámetro que demostró mayor asociación con el balance parcial de N en vicia, con un incremento de 2,2 y 4,2 kg N en el balance parcial de N por unidad de incremento de %Nd_{fa} en plena floración y madurez fisiológica, respectivamente (Figura 3.8). Mientras que la biomasa total acumulada se relacionó en menor medida con el balance parcial de N, demostrando que se necesitan 75 kg ha⁻¹ de biomasa por cada kg extra de aumento en el balance parcial de N (Figura 3.5.a anexo).

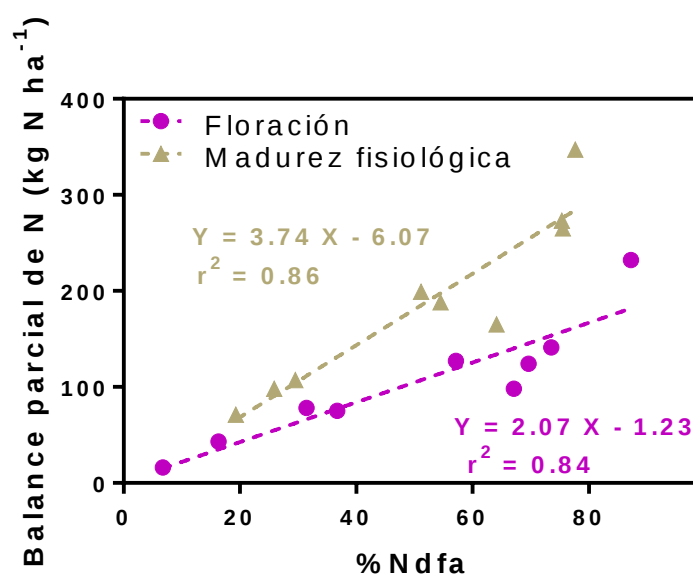


Figura 3.8. Relación entre el balance parcial de N en vicia para diferentes fechas de siembra en un solo año (Experimento 2), incluyendo N de FBN subsuperficial a 30 cm de profundidad, con la proporción de N derivado de la fijación biológica de N (%Nd_{fa}). Las líneas discontinuas representan la regresión lineal. El sitio de estudio fue la región pampeana norte de Argentina.

3.4 DISCUSIÓN

Las leguminosas de invierno juegan un papel estratégico para la reposición de los niveles de N del suelo, especialmente en agroecosistemas donde predominan los cultivos de verano, como en la Región Pampeana Argentina, el Cinturón Maicero en EE.UU., o los Cerrados en Brasil (Battisti et al., 2020; Correndo et al., 2022; Restovich

et al., 2012). Para las leguminosas cultivadas como cultivos de cobertura, reponer los niveles de N del suelo es bastante fácil de lograr, ya que no hay productos cosechados y, por lo tanto, siempre se esperan balances parciales de N positivos. En este caso, la magnitud de la contribución neta de N al sistema agrícola dependerá de la producción de biomasa y, en particular, de la cantidad de N de FBN (Enrico et al., 2020). Para los cultivos destinados a producir granos, una contribución positiva de N es más difícil de alcanzar y sólo ocurrirá si las entradas de N a través de FBN exceden el N exportado en los granos. Por lo tanto, cuanto mayor sea la FBN, mayor será el aporte de N al sistema, por lo que maximizar la FBN es siempre un resultado deseado.

En el cultivo de arveja, O'Connor et al., (1993) encontraron que la combinación de cultivares de ciclo largo y fechas de siembra tempranas incrementa la producción de biomasa, la absorción de N y la FBN. En este estudio, argumentamos que, dado que existe una ventana estrecha para la siembra de arveja en el norte de la región Pampeana, el balance parcial de N puede ser mejorado mediante la inclusión de cultivares con diferente estructura de planta que logran diferente ICN y por lo tanto relativamente menores extracciones de N (e.g. cultivares foliosos y semiáfilos). Los resultados de este estudio no apoyan la primera hipótesis, ya que no fueron concluyentes en cuanto al signo final del balance parcial de N. Sin embargo, y en línea con ésta hipótesis, encontramos un mayor balance de N en los cultivares que alcanzaron un IC bajo, a pesar de no haber diferencias en biomasa total, absorción de N o %Ndfa entre cultivares en madurez fisiológica. Estudios previos que compararon cultivares de arveja mostraron una baja variabilidad en la producción de biomasa (Abi-Ghanem et al., 2011; Beck et al., 1991). Sin embargo, como el IC puede variar ampliamente de acuerdo a la naturaleza dinámica de las relaciones fuente/destino de la planta (Sadras y Calderini, 2020), entonces el balance de N estaría más estrechamente asociado con el ICN que con la biomasa total, independientemente de la biomasa y el N-FBN. Por otro lado, O'Connor et al., (1993) mostraron que la biomasa extra producida en fechas tempranas de siembra dependía relativamente más del N proveniente de FBN que del N del suelo, por lo que potencialmente mejoraría el balance parcial de N. Entonces, en ambientes de la región pampeana, la combinación de genotipos con mayor duración de ciclo y fechas de siembra tempranas, resultaría en una mayor producción de biomasa y aporte de FBN para el mismo rango de IC, pero esta estrategia dependerá de cómo se incluya la arveja en la secuencia de cultivos (es decir, fechas de cosecha del cultivo anterior y siembra del cultivo siguiente). Por ejemplo, la arveja puede dejar un mayor contenido de agua en el suelo en el momento de la cosecha respecto la vicia (dependiendo de la fecha de terminación de la vicia) y afectar así positivamente a los cultivos siguientes en la rotación. Esto se debe a los menores requerimientos hídricos

de arveja (10,3 kg grano/mm Andrade et. al., (2015)), que representaron un consumo de 167 mm según el rendimiento promedio de este experimento, mientras que los mayores requerimientos hídricos de vicia (16,9 kg MS/mm, Renzi y Cantamutto, (2013)), alcanzaron consumos de c.a. 400 mm a floración y c.a. 620 mm hasta madurez. Relacionando estos consumos de agua con el N-FBN observamos que arveja aporta 0,28 kg N-FBN/mm, mientras que vicia aportó 0,12, 0,24 y 0,37 kg N-FBN/mm en siembras tempranas, intermedias y tardías respectivamente tanto en floración como madurez fisiológica.

En contraste con la segunda hipótesis que afirmaba que retrasar las fechas de siembra reduce la biomasa del cultivo y la FBN en vicia, tanto en plena floración como en madurez fisiológica, se encontró que en plena floración la fecha de siembra temprana mostró la biomasa y acumulación de N total absorbido más alto, sin diferencias estadísticas por atraso de fecha de siembra. Sin embargo, el N de FBN fue menor en siembras tempranas en comparación con las fechas de siembra intermedia y tardía, con la consecuencia final de disminuir el balance parcial de N. Además, en madurez fisiológica, la biomasa y la absorción de N no difirieron entre las fechas de siembra, pero la contribución de FBN siguió siendo la más alta en las fechas de siembra intermedia y tardía. En ambos casos, el aumento de FBN a medida que se retrasaba la fecha de siembra en este cultivo de cobertura invernal puede estar relacionado con las temperaturas más altas, que pueden haber beneficiado el proceso de FBN. Dart y Day, (1971) demostraron que la temperatura óptima para la FBN en Vicia sativa era de 20 °C, y que las temperaturas inferiores a 10 °C disminuyen la actividad de los nódulos. Por lo tanto, incluso cuando la fecha de siembra temprana tuvo un período de crecimiento más largo, con un aumento coincidente con la producción de biomasa y la absorción de N, el balance parcial de N fue el más bajo ya que el cultivo estuvo expuesto a temperaturas que no optimizaron la FBN. La comparación entre fechas de siembra sólo abarcó un año, por lo tanto, los resultados deben tomarse con cautela. No obstante, proporciona información valiosa sobre los efectos potenciales de las diferentes épocas de siembra, que otros estudios deberían confirmar. Este es el primer estudio que demuestra diferencias en la biomasa subsuperficial, siendo importante para conocer las diferencias en los balances de N según las fechas de siembra.

La mayoría de los estudios que cuantificaron el balance parcial de N de los cultivos de leguminosas no tuvieron en cuenta la contribución de la FBN de las estructuras subsuperficiales. Una estimación precisa de esta contribución es esencial para cuantificar la incidencia sobre varios servicios ecosistémicos, como el ciclo de nutrientes o el secuestro de carbono (Jackson et al., 2017), que son pilares de las prácticas de intensificación de la agricultura sostenible como las rotaciones de cultivos

y la inclusión de cultivos de cobertura (Mazzilli et al., 2015; Pinto et al., 2017). En el presente estudio, se estimó con precisión el N subsuperficial basado en una cuantificación detallada de la biomasa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad. En arveja, los resultados de este capítulo indicaron que la proporción de biomasa en estructuras subsuperficiales en el estadio de madurez fisiológica fue del 5%, aproximadamente como en estudios anteriores, pero la proporción de N en esas estructuras subsuperficial fue menor (2%) (Tabla 3.6). Por el contrario, en vicia encontramos que la biomasa y la proporción de N absorbido respecto el N total en las estructuras subsuperficiales eran del 12 y 11% respectivamente en plena floración, y disminuían al 3% y 2% en madurez, por debajo de los informes anteriores (Tabla 3.6). Los bajos contenidos de N en biomasa subsuperficial explicarían por qué la inclusión de esta fuente de N no incrementó sustancialmente el requerimiento interno de N (Figura 3.2, a) con respecto a estimaciones previas (Enrico et al., 2020), por lo que las estructuras subsuperficiales hicieron una contribución menor a lo esperado al balance parcial de N. Es importante señalar que esta proporción puede aumentar si se incluye en el cálculo el N proveniente de las rizodeposiciones. Wang et al., (2021) estimaron para varias leguminosas que las rizodeposiciones pueden aportar 53 mg de N por g de biomasa radical. Entonces, usando los valores de este trabajo (Tablas 3.2 y 3.4), las rizodeposiciones puede contribuir con 10-15 kg N ha⁻¹ adicionales en arveja y 9-31 kg N ha⁻¹ en vicia. Sin embargo, las estimaciones de los aportes de rizodeposiciones en condiciones de campo son todavía un reto, y deben estimarse los valores específicos de cada cultivo asociados a las condiciones ambientales y de manejo del cultivo.

Tabla 3.6. Biomasa subsuperficial (BS) y N subsuperficial (N-BS) como proporción (%) de la biomasa total y el nitrógeno total de arveja y vicia según los métodos de medición y las profundidades (m) comunicados en este estudio y por diferentes autores.

Cultivo	Metodo de medicion	Prof m	Proporcion de BS		Proporcion de N-BS	
			Floración	Madurez	Floración	Madurez
Arveja						
Este estudio	Excavación de bloques a campo	0,3	18,6	4,9	9,9	2,1
Arcand et al., 2013a	Invernadero	0,2	-	4,2	-	4,1
Arcand et al., 2013b	Invernadero	0,3	23,5	4,9	8,6	3,7
Armstrong et al., 1994a, b.	Cilindros		14,1	12,1	18,7	7,0
Gan et al., 2009	Lisímetros	1,0	17,6	10,9	-	-
Haynes et al., 1993	Excavacion de bloques a campo	0,4	-	-	-	4,8
Izaurre et al., 1991	Cilindros	0,3	-	11,8	-	11,2
Soon & Ashad 2002	Excavación de bloques a campo	0,125	-	3,6	-	10,2
Vicia						
Este estudio	Excavación de bloques a campo	0,3	11,9	2,9	11,1	2,5
Pinto et al., 2021	Excavación de bloques a campo	0,2	-	25,3	-	23,4
Li et al., 2015	Excavación de bloques a campo	0,18	-	39,5	-	28

En vicia, estudios previos en condiciones de campo demostraron un amplio rango de balances parciales de N, de 38 a 265 kg N ha⁻¹ (Enrico et al., 2020; Hayden et al., 2014; Parr et al., 2011; Poffenbarger et al., 2015; Rochester y Peoples 2005). Sin embargo, en todos los casos, estos balances pueden estar subestimados, ya que no se tuvieron en cuenta las mediciones de los aportes de N de las estructuras subsuperficiales. En los experimentos de esta tesis con vicia, considerando únicamente los aportes aéreos, los balances positivos oscilaron entre 49 y 145 kg N ha⁻¹ en floración, y entre 59 y 292 kg N ha⁻¹ en madurez. Incluso cuando se evaluó para la producción de semillas o "cultivo comercial" (es decir, estimando el N de la planta en madurez fisiológica y descontando el N extraído en granos), se siguió encontrando balances parciales de N positivos, que oscilaban entre 30 y 234 kg N ha⁻¹, reflejando un fuerte contraste con el cultivo de arveja.

La inclusión del N de FBN subsuperficial en madurez aumentó el balance parcial de N en 1 y 4 kg ha⁻¹ en arveja y vicia, respectivamente, apoyando la tercera hipótesis de nuestro estudio. Estas cifras incluyeron la biomasa subsuperficial hasta 30 cm, pero asumiendo que una proporción de biomasa subsuperficial no recuperada por debajo de 0,3 - 1,10 m de profundidad puede representar el 32% de la biomasa subsuperficial total para las leguminosas de invierno (Fan et al., 2016), entonces el aporte total de N de FBN hasta 1,10 m de profundidad aumentaría el balance parcial de N a 2 y 5 kg N ha⁻¹

en arveja y vicia, en madurez, respectivamente. Si consideramos el N de FBN total de las estructuras subsuperficiales en floración en vicia hasta 1,1 m de profundidad, el balance parcial de N aumentaría en 2 kg de N. A pesar que estos aportes extra subsuperficiales de N-FBN demostraron ser estadísticamente significativos al incluirlos al balance de N, los aportes netos de N-FBN de raíces y nódulos de vicia y arveja no fueron significativas en términos agronómicos.

El balance parcial de N calculado en vicia en plena floración fue 50% inferior al calculado en madurez fisiológica (Figura 3.7, a y c). Sin embargo, el N de FBN de las estructuras subsuperficiales en plena floración fue de 9 kg N ha⁻¹, representando una contribución mucho mayor al balance parcial que considerando el N de FBN en la madurez (una media de 4 kg N ha⁻¹) (Tabla 3.5). Una disminución significativa del N de FBN subsuperficial entre la etapa vaina plana (arveja)-floración (vicia) y la madurez fisiológica sugiere que parte del N subsuperficial puede haber sido movilizado a estructuras aéreas o transferido al suelo a través de la descomposición de las raíces, como se ha observado en estudios previos (Arcand et al., 2013a; Gan et al., 2010; Gan et al., 2009). En este estudio, asumiendo que la disminución observada en la biomasa subsuperficial entre la biomasa de plena floración y la madurez permaneció enteramente en el suelo, ésta contribución representaría un aporte extra de c.a. 3 y 5 kg N de FBN ha⁻¹ en arveja y vicia al balance parcial de N al final del cultivo. Por lo tanto, futuros estudios deberían cuantificar también cuánto de este N subsuperficial se libera al suelo y qué proporción se moviliza a las estructuras aéreas. Por otro lado, aunque arveja y vicia mostraron grandes diferencias en la producción total de biomasa, mostraron un requerimiento de N similar estadísticamente de aproximadamente 27,5 kg de N por Mg de biomasa (Figura 3.2, a).

Como era de esperar, vicia, como cultivo de cobertura, fue más eficaz en términos de aportes netos de N al sistema que la arveja, que conlleva extracción de 75 kg de N por Mg de granos exportados. Estos requerimientos de arveja fueron elevados respecto resultados de bibliografía previa, sin embargo, se encuentran dentro de los rangos reportados por Enrico et. al., (2020) (54-76 kg N por Mg grano).

Ambos cultivos evaluados contribuirán a una agricultura sostenible al proporcionar diferentes servicios ecosistémicos. A corto plazo, el cultivo de vicia proporcionará N a los cultivos posteriores con una reducción simultanea del uso de fertilizantes sintéticos (Carciochi et al., 2023; Enrico et al., 2020), y también mejorando los parámetros de fertilidad del suelo a largo plazo (Ashworth et al., 2020; Conceição et al., 2013; Duval et al., 2016). El cultivo de arveja puede contribuir positivamente a una intensificación sostenible de la agricultura al proporcionar valiosos servicios ecosistémicos (Arcand et al., 2013b; Caviglia y Andrade, 2010). Por ejemplo, la inclusión

de éste en la rotación de cultivos no sólo permite la inclusión de un cultivo comercial, sino también una fecha de siembra más temprana para el siguiente cultivo de verano en comparación con otros cultivos comerciales de invierno (como el trigo, que es el principal cultivo de invierno en la zona). Además, la arveja puede dejar un mayor contenido de agua en el perfil del suelo (Sadras y Calderini, 2020) en comparación con los cereales de invierno y vicia, lo que puede afectar positivamente al rendimiento del siguiente cultivo comercial de verano. Otra implicación práctica de estos resultados es que la contribución de N de vicia como cultivo de cobertura será mayor si se mantiene hasta plena floración o durante un periodo más largo. Sin embargo, esto retrasaría la fecha de implantación del cultivo siguiente, con la consiguiente disminución del contenido de agua del suelo.

3.5. CONCLUSIONES

El cultivo de arveja dio lugar a balances de N que oscilaron entre ligeramente negativos (-21 kg N ha^{-1}), a ligeramente positivos ($+16 \text{ kg N ha}^{-1}$), mientras que en vicia los balances positivos de N variaron de 60 y 295 kg N ha^{-1} . Estos balances parciales de N mejoraron significativamente con la inclusión de los aportes de N de FBN de estructuras subsuperficiales, aunque en muy baja magnitud. Es necesario realizar estimaciones precisas de la dinámica del N subsuperficial y las rizodeposiciones entre estadíos de vaina plana/floración y madurez, para afinar aún más los balances de N. Centrar la investigación futura en estos elementos sería más eficaz para ajustar las estimaciones del balance de N que extender las mediciones de biomasa a capas más profundas del suelo, que son más laboriosas y requieren más tiempo.

En el cultivo de arveja, los diferentes genotipos probados en este experimento ejercieron efectos menores sobre la biomasa y el %Ndfa, mientras que en vicia las fechas de siembra tuvieron un fuerte impacto sobre estas variables. El N derivado de FBN, y en consecuencia el balance parcial de N en plena floración de vicia resultó ser mayor al retrasar las fechas de siembra, alcanzando esto con una menor biomasa del CC respecto siembras tempranas, pudiendo significar un menor consumo de agua con el consiguiente beneficio para el cultivo siguiente, además del mayor aporte de N vía FBN.

CAPÍTULO 4

Balance de nitrógeno en ensayos de larga duración

4.1 INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es el nutriente más importante que limita el rendimiento de los cultivos en todo el mundo (Fageria et al., 2005), y el suelo es la principal fuente natural de este nutriente para las plantas, aportando todo el N que pueden absorber los cultivos de cereales y aproximadamente 58% del N total en cultivos que fijan los restantes requerimientos de N mediante simbiosis (Peoples et al., 2021). Sin embargo, las formas químicas de N inorgánico disponible (Ni) para los cultivos se encuentran en baja proporción en el suelo como NO_3^- o NH_4^+ . Esto se debe, tanto a la dinámica de pérdidas del Ni del suelo, como a la extracción neta de nutrientes a través de granos y semillas (Díaz de Astarloa y Pengue, 2018) en sistemas agrícolas continuos, que genera una menor fuente de N orgánico en suelos y, al uso de dosis de fertilización por debajo de los niveles de reposición de los cultivos (Correndo et al., 2021). Por lo tanto, para lograr una agricultura sostenible, las rotaciones de cultivos deben orientarse a mejorar los niveles de nutrientes disponibles en el suelo, y reducir la dependencia de fertilizantes externos.

Este principio de manejo de los nutrientes forma parte de los fundamentos detrás de la "intensificación agrícola sustentable" (IAS) (Caviglia y Andrade, 2010), que busca incrementar la ocupación del suelo en el momento de plantear secuencias de cultivos ya sea incorporando cultivos de grano o cobertura durante los períodos de barbecho invernales. Esto aumentará la captura y eficiencia del uso de los recursos (nutrientes, radiación y agua), traducándose en un mayor aporte de nutrientes como C y N orgánico al suelo, que incrementarían el rendimiento de los cultivos en el largo plazo y la conservación del suelo (Novelli et al., 2023).

El aporte de C y N a escala del sistema proviene principalmente de formas gaseosas, que son fijadas primero por los cultivos para la producción de biomasa y luego son liberados al suelo mediante la secreción de exudados radicales, y la mineralización de los restos vegetales (Mary et al., 1996). Sin embargo, la proporción y magnitud de los aportes de N-FBN, C y N proveniente de la mineralización de residuos orgánicos, es variable en cada región debido a las condiciones edafoclimáticas predominantes en cada una de ellas.

Como se mencionó en capítulos anteriores, la FBN simbiótica es responsable de una gran cantidad de aportes de N en los sistemas de cultivo (Unkovick, 2008) a través de la descomposición de residuos ricos en N que ocurre posterior a la cosecha o finalización de cultivos de leguminosas. Estos aportes, podrían reducir las necesidades de fertilizantes para los cultivos siguientes (Crews y Peoples 2004; Enrico et al., 2020; Nemecek et al., 2008) a corto plazo, y puede tener una contribución positiva a las

reservas de N orgánico del suelo a largo plazo, reduciendo los costos de producción de los cultivos y preservando la productividad del recurso suelo. Yan et al., (2020) determinaron que la mayor parte del N absorbido por el cultivo, procede del reciclado del N del suelo y de los residuos de los cultivos, y en menor cantidad del N fertilizado en el mismo año. Por lo tanto, los residuos de los cultivos pueden mejorar la salud del suelo por medio del aporte de cobertura y biomasa, que, según la cantidad y su composición se traducirá en un almacenamiento o pérdida de C orgánico total y N orgánico total del suelo. Sin embargo, los cambios en los contenidos de estos nutrientes en suelo son procesos naturalmente lentos y sólo pueden evaluarse en secuencias de cultivo a largo plazo (Salvagiotti et al., 2017).

Debido a que el COT y NOT son poco sensibles a los cambios en corto plazo por prácticas de manejo diferenciales, las determinaciones de éstos parámetros en las fracciones de separación física de suelo comprendido entre 53 y 2000 μm de diámetro (carbono orgánico particulado y nitrógeno orgánico particulado), han demostrado ser indicadores más sensibles y dinámicos frente a los cambios en el uso y manejo del suelo, demostrando diferencias en COP y NOP en el corto y mediano plazo a diferentes prácticas de manejo (fertilización, labranza, rotación de cultivos, etc).

Estos cambios en la secuencia de cultivos modificarán la dinámica del C y el N en el sistema, especialmente si se incluyen leguminosas que aporten N por medio de FBN. En una revisión exhaustiva del efecto del manejo del N en el secuestro de C, en suelos cultivados, Christopher y Lal, (2007) concluyeron que, en la mayoría de los casos, la adición de N tenía un efecto limitado o, más probablemente, daba lugar a un aumento del carbono orgánico del suelo (COS). Esto se atribuyó al hecho de que el COS estaba relacionado linealmente con la cantidad y composición de residuos de cultivos devueltos al suelo y la producción de éstos residuos estaba directamente relacionada con la adición y absorción de N.

Muchos trabajos han evaluado el efecto de la inclusión de leguminosas a escala de cultivo y los aportes de N (Danga et al., 2009; Kumar y Goh, 1999), sin embargo, pocos estudios han analizado el rol de la FBN en estos aportes y a los balances parciales de N en el mediano o largo plazo, incluyendo aportes de biomasa subsuperficial.

Teniendo en cuenta que los planteos de intensificación sustentable de la producción en los sistemas de agricultura continua implican una mayor ocupación del suelo con cultivos durante el invierno, los aportes adicionales de N al sistema proveniente de la biomasa de estos cultivos dependerán de la proporción de cultivos leguminosos que se incluyan en este periodo y del destino de estos cultivos (i.e. para grano o como cultivo de cobertura).

En base a esto, en el presente capítulo se pondrán a prueba las siguientes hipótesis

Hipótesis 4.1 (asociada al **objetivo 4.1**): Las rotaciones con mayor proporción de leguminosas en las secuencias presentaran balances de N más positivos.

Hipótesis 4.2 (asociada al **objetivo 4.1**): La inclusión de leguminosas invernales como cultivo de cobertura hará una contribución mayor de N al sistema vía FBN comparado con su inclusión como cultivo de renta.

Hipótesis 4.3 (asociada al **objetivo 4.1**): La inclusión de arveja como leguminosa de grano hará una mayor contribución de N-FBN al sistema respecto rotaciones sin inclusión de cultivos de invierno.

Hipótesis 4.4 (asociada al **objetivo 4.2**): En la medida que los balances parciales de N sean más positivos, se incrementarán los contenidos de COT, NOT y NOP del suelo.

Hipótesis 4.5 (asociada al **objetivo 4.2**): En secuencias donde soja esta rotada con diferentes proporciones de gramíneas, el aporte de N a través de la FBN de la soja no cambiará los contenidos de NOT y NOP del suelo en el largo plazo, aunque si los de COT y COP por la contribución realizada por las gramíneas.

Hipótesis 4.6 (asociada al **objetivo 4.3**): Cuando se incluyen los aportes acumulados de C de biomasa de raíces habrá una mayor asociación a los cambios de COT del suelo que cuando se consideran solo los aportes de la biomasa aérea de los cultivos.

Hipótesis 4.7 (asociada al **objetivo 4.4**): Cuando se incorpora los aportes acumulado de N-FBN de raíces, los balances de N del sistema mejorarán significativamente.

Los objetivos de este capítulo fueron:

Objetivo 4.1. Cuantificar el efecto de secuencias de cultivo con diferente grado de ocupación del suelo, con gramíneas o leguminosas, sobre el balance de N y el aporte de la FBN al balance de N.

Objetivo 4.2. Cuantificar el efecto de secuencias de cultivo con diferente grado de ocupación del suelo, con gramíneas o leguminosas, sobre los cambios sobre el C y N total y orgánico del suelo.

Objetivo 4.3. Estudiar el impacto de la inclusión de C y N de la biomasa aérea y subsuperficial de los cultivos sobre el C y N del suelo.

Objetivo 4.4. Cuantificar los aportes acumulados de N-FBN a los balances de N del sistema

Para ello, se trabajó en dos experimentos de larga duración, el primero evalúa secuencias soja-soja y soja-maíz combinadas con distintas opciones de cultivos de invierno de grano y cobertura leguminosa luego de 6 años de iniciado (ELD1) y el

segundo evalúa diferentes secuencias de cultivos con diferente proporción de inclusión de cereales de grano en rotación con soja, con diferente grado de ocupación del suelo con y sin la inclusión de cultivos de cobertura (ELD2).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

La investigación se realizó en dos experimentos de larga duración iniciados en 2012 (ELD1) y 2009 (ELD2) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros (32°34'06,08" S 60°51'28,23" O) (Figura 4.1).



Figura 4.1. Localización de los experimentos de larga duración en la EEA INTA Oliveros, Sur de Santa Fe.

Ambos experimentos de larga duración se implantaron en suelo Argiudol Típico, serie Maciel descrito en los capítulos anteriores (2.2 y 3.2). Al inicio de los tratamientos cada sitio presentaba 30 años de agricultura continua, con predominio de rotación trigo/soja y 25 años de siembra directa.

En cada experimento se implantaron variedades e híbridos de alto potencial de rendimiento con fechas de siembra y densidades según las recomendaciones locales para que los cultivos manifiesten su potencial. Las leguminosas se inocularon cada año previo a la siembra con *Bradyrhizobium japonicum* (E109, 2,5 mL kg⁻¹ semilla) en soja,

y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* (5 mL kg⁻¹ semilla) en vicia y arveja. Todos los cultivos se implantaron en siembra directa.

4.2.1 Descripción de rotaciones

4.2.1.1 ELD1 – Ensayo de larga duración 1

El ELD 1, iniciado en 2012, evalúa la inclusión de distintas alternativas de intensificación con cultivos de invierno en el largo plazo en secuencias soja-soja y maíz-soja. Los tratamientos incluyen la combinación de 4 alternativas durante el invierno: dos cultivos de cosecha, arveja (Arv) y trigo (Trg), un cultivo de cobertura, vicia villosa (Vic) y un tratamiento sin cultivo de invierno (barbecho) (BB). Posterior a este doble cultivo sigue un cultivo de soja de primera (Sj). En consecuencia, las rotaciones comienzan nuevamente luego de dos campañas completas y cada secuencia posee un índice de intensificación (II) que representa el porcentaje del tiempo ocupado con cultivos en el año. Además, se calculó el II de gramíneas e II de leguminosas, como el porcentaje del año ocupado con gramíneas o leguminosas.

En la Tabla 4.1 se puede observar las 8 secuencias evaluadas durante 3 ciclos completos de rotación en el ELD1 (2012- 2018). En este experimento, no estuvieron presente todas las secuencias de rotación en un mismo año.

Las distintas secuencias se arreglaron en un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. La superficie de cada parcela fue de 5 x 22,5 m (108 m²).

Tabla 4.1. Secuencias de cultivos, e índice de intensificación (II) de cada rotación en ensayo de larga duración 1 (ELD1).

Rotación	II	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
Arv/Mz-Sj	0,61	Arveja/Maíz	Soja	Arveja/Maíz	Soja	Arveja/Maíz	Soja
Vic/Mz-Sj	0,65	Vicia/Maíz	Soja	Vicia/Maíz	Soja	Vicia/Maíz	Soja
Trg/Mz-Sj	0,65	Trigo/Maíz	Soja	Trigo/Maíz	Soja	Trigo/Maíz	Soja
BB/Mz-Sj	0,43	Maíz	Soja	Maíz	Soja	Maíz	Soja
Arv/Sj-Sj	0,57	Arveja/Soja	Soja	Arveja/Soja	Soja	Arveja/Soja	Soja
Vic/Sj-Sj	0,61	Vicia/Soja	Soja	Vicia/Soja	Soja	Vicia/Soja	Soja
Trg/Sj-Sj	0,61	Trigo/Soja	Soja	Trigo/Soja	Soja	Trigo/Soja	Soja
BB/Sj-Sj	0,39	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja

Los cultivos invernales fueron fertilizados a la siembra con P (ca. 20 kg P ha⁻¹) utilizando como fuente fosfato monoamónico o superfosfato triple de calcio para cubrir la demanda del doble cultivo. El cultivo soja posterior al doble cultivo fue fertilizado con dosis de P (ca. 10 kg P ha⁻¹).

Previo a la siembra del maíz y el trigo, se tomaron muestras de suelo a 0-20, 20-40 y 40-60 cm de profundidad para determinar contenido de nitratos (Bremner 1965) y se estimó la fertilización nitrogenada según umbrales de respuesta: $N_{\text{inicial}} + N_{\text{fert}} = 162$ kg N ha⁻¹ para maíz (Salvagiotti et al., 2011) y $N_{\text{inicial}} + N_{\text{fert}} = 135$ kg N ha⁻¹ para trigo (Ferrari et al., 2009). La fertilización se realizó con urea (46-0-0) al voleo en estadio V3 de maíz (Ritchie et. al., 1993) y previo al macollaje en trigo. El secado de la vicia se realizó en mediados de noviembre, mediante la combinación de control mecánico (rolo) en primera instancia y luego control químico.

4.2.1.2 ELD2 - Ensayo de larga duración 2

El ELD2 se inició en el año 2009, incluye tratamientos que combinan tres secuencias de cultivos con distinta participación de soja y cereales, con y sin la inclusión de cultivos de cobertura. Cada secuencia se caracteriza por su índice de intensificación. Las secuencias de cultivos son:

- 1A) Soja-Soja (Sj-Sj): (II = 0,39)
- 2A) Maíz-Soja-Trigo/Soja (Mz-Sj-Trg/Sj): (II = 0,55)
- 3A) Maíz-Trigo/Soja (Mz-Trg/Sj) (II= 0,64)

Con la inclusión del cultivo de cobertura invernal (CC) se incluyen las siguientes secuencias:

- 1B) CC/Soja-CC/Soja (Sj- CC- Sj) (II = 0,69)
- 2B) Maíz-CC/Soja-Trigo/Soja (Mz- CC- Sj-Trg/Sj) (II = 0,64)
- 3B) CC/Maíz-Trigo/Soja (Mz-Trg/Sj-CC) (II= 0,80)

El cultivo de cobertura utilizado fue un trigo de ciclo corto previo a la soja de primera hasta el año 2016, luego fue reemplazado por un cultivo de vicia previo al cultivo de maíz. El cultivo de cobertura fue secado durante la etapa de encañazón cuando fue trigo, y en plena floración cuando fue vicia. En general, el secado se realizó al menos 30 días previos a la siembra del cultivo estival posterior. Solo el CC de la rotación CC/Sj-CC/Sj recibió fertilización nitrogenada en cada campaña (23 kg N ha⁻¹), y en las restantes rotaciones no se fertilizaron los CC. El diseño experimental fue en bloques

completos al azar con tres repeticiones, en parcelas de 13 x 50 m (650 m²). Todas las fases de la rotación están presentes cada año. En la Tabla 4.2 se presenta el esquema detallado de cada rotación y el cultivo presente en cada año según la fase de rotación.

Tabla 4.2. Secuencias de cultivos, e índice de intensificación (II) de cada rotación en ensayo de larga duración 2 (ELD2).

Secuencia	II	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19	2019/20
Sj-Sj	0,39	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja	Soja
CC/Sj-CC/Sj	0,69	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja	CC/Soja
Mz-Sj-Trg/Sj	0,55	Maíz	Soja	Trigo/soja	Maíz	Soja	Trigo/soja	Maíz	Soja	Trigo/soja	Maíz	Soja
Mz-CC/Sj-Trg/Sj	0,64	Maíz	CC/Soja	Trigo/soja	Maíz	CC/Soja	Trigo/soja	Maíz	CC/Soja	Trigo/soja	Maíz	CC/Soja
Mz-Trg/Sj	0,64	Trigo/soja	Maíz	Trigo/soja	Maíz	Trigo/soja	Maíz	Trigo/soja	Maíz	Trigo/soja	Maíz	Trigo/soja
CC/Mz-Trg/Sj	0,80	Trigo/soja	CC/Maíz	Trigo/soja	CC/Maíz	Trigo/soja	CC/Maíz	Trigo/soja	CC/Maíz	Trigo/soja	CC/Maíz	Trigo/soja

4.2.2 Determinaciones de biomasa en los cultivos

Desde el inicio de ambos ensayos, en madurez fisiológica en todos los cultivos de cosecha se determinó la producción de grano de cada parcela pesando toda la cantidad de grano extraída mediante cosecha mecanizada y midiendo la humedad promedio del grano en cada parcela. Las estimaciones finales del rendimiento se obtuvieron ajustando el rendimiento a un contenido de humedad estándar de 14,5% de humedad para el maíz, 14% para trigo, y 13,5% para soja, o expresándolos en base a la materia seca para los cálculos de N de biomasa y grano.

Previo a la cosecha de granos, y al momento del secado del CC, se realizó una cosecha manual de cada cultivo tomando tres muestras de 1m² para determinar la materia seca (kg ha⁻¹) y la concentración de N en el tejido vegetal aéreo (tallos, hojas, carpelos/chala y grano). Las muestras fueron secadas a 60 °C hasta peso constante y molidas para determinar la concentración de N total (%N) a través de semi-micro Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973).

El índice de cosecha y la concentración de N medidas en las muestras cosechadas a mano se promediaron para cada parcela y se utilizaron en combinación con el resultado de rendimiento de grano de toda la parcela, para calcular la biomasa aérea total (Mg ha⁻¹) de la misma, y el N total (kg ha⁻¹) de cada estructura (Verma et al., 2005).

Para incluir los aportes de la biomasa de estructura subsuperficiales, se determinó la masa de las mismas en función de la proporción que ésta representa de la biomasa aérea en madurez fisiológica para cada cultivo de grano, o cercano al momento de secado de los cultivos de cobertura (Tabla 4.3). Con la información de la biomasa de cada estructura de los cultivos, y utilizando los valores de contenido de C obtenidos en

trabajos previos (Tabla 4.4), se calculó el C en granos (C grano) y el C de estructuras vegetativas (incluyendo el C de residuos aéreos + C de raíces) (Cveg), multiplicando la biomasa de cada estructura con la concentración de C total correspondiente a cada estructura de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_{veg} (kg C ha^{-1}) = MS_{veg\ aérea} (kg ha^{-1}) \times \%C_{veg\ aéreo} + MS_{raíces} (kg ha^{-1}) \times \%C_{raíces} \text{ (Ecuación 4.1)}$$

$$C_{grano} (kg C ha^{-1}) = MS_{grano} (kg ha^{-1}) \times \%C_{grano} \text{ (Ecuación 4.2)}$$

Tabla 4.3. Porcentaje de biomasa de estructuras subterráneas (raíces y nódulos) hasta los 30 cm de profundidad en relación a la biomasa total del cultivo y concentración de N (%).

Cultivo		Biomasa subsubperiférica (%)	Fuente	Nitrógeno (%)	Fuente
Cultivo de grano	Soja	10,2	Datos propios	1,4	Datos propios
	Arveja	4,8	Datos propios	1,9	Datos propios
	Trigo	9,5	Datos propios	0,9	Datos propios
	Maíz	12,7	Amos y Walters (2006) Hirte et al. (2018) Bolinder et al. (2007)	0,8	Peng, Y et. al, 2010
Cultivo	Vicia	11,1	Datos propios	2,4	Datos propios
cobertura	Trigo	26,5	Datos propios	0,8	Datos propios

Tabla 4.4. Concentración de carbono total (%) en distintas estructuras de cultivos.

Cultivo	Raíz	Residuos aéreos	Grano
Maíz ¹	41,9	39,7	42
Trigo	38,3	40,5	42,9
Vicia	38,1	37,6	-
Soja ²	43,4	42,5	49,8
Arveja	41,3	43,2	42,3

¹Valores utilizados para maíz temprano, tardío y de segunda.

²Valores utilizados en soja de primera y soja de segunda.

La concentración de N en raíces utilizada provino de experimentos propios y de referencia para cada cultivo y estadio correspondiente (Tabla 4.3). La cantidad de N absorbido (kg N ha⁻¹) en estructuras vegetativas incluyendo raíces (N veg) y granos (N grano), se calculó multiplicando la biomasa de cada estructura con la concentración de N total correspondiente a cada tejido (N veg y N grano):

$$N_{veg} (kg N ha^{-1}) = MS_{veg\ aérea} (kg ha^{-1}) \times \%N_{veg\ aéreo} + MS_{raíces} (kg ha^{-1}) \times \%N_{raíces} \text{ (Ecuación 4.3)}$$

$$N_{\text{grano}} (\text{kg N ha}^{-1}) = MS_{\text{grano}} (\text{kg ha}^{-1}) \times \%N_{\text{grano}} \text{ (Ecuación 4.4)}$$

Los datos faltantes de N en biomasa (kg N ha^{-1}) en ELD2, se calculó en función del índice de cosecha de N de cada cultivo, como la relación entre N del grano y el índice de cosecha de N ($\text{ICN}_{\text{soja}}=0,73$, $\text{maíz}=0,69$ y $\text{trigo}=0,66$). Y en el caso de datos faltantes de N de granos (kg N ha^{-1}) en ELD2, el mismo se calculó según la relación entre rendimiento en grano seco (kg ha^{-1}) y N absorbido en grano (kg N ha^{-1}) con los datos disponibles del mismo experimento para cada cultivo (soja; $Y=18,2X$ $r^2=0,73$, maíz; $Y=89,5X$ $r^2=0,80$, trigo; $Y=36,7X$ $r^2=0,86$).

Para determinar la FBN, previo a madurez fisiológica, se cosecho 1 m^2 de biomasa aérea de las leguminosas evaluadas y un cultivo de referencia (maíz resistente a glifosato en soja; trigo en leguminosas invernales). Una vez molidas y pesadas las muestras se enviaron a laboratorio y se determinó la concentración de isótopos ^{15}N por espectrometría de masa. El porcentaje de N proveniente de FBN ($\%N_{\text{dfa}}$) se determinó principalmente a través de la abundancia natural de ^{15}N (Shearer y Kohl, 1986), como se especificó en capítulos anteriores (Ecuación 3.1). En ambos ensayos de larga duración, el valor B utilizado en la ecuación 3.1 para el cultivo de soja fue -1,032 (Collino et al., 2015), y en vicia y arveja -0,39 y -0,33 (Enrico et al., 2020).

El N fijado por las leguminosas (kg N-FBN ha^{-1}) se determinó como el producto del N total absorbido ($N_{\text{veg}} + N_{\text{grano}}$) y $\%N_{\text{dfa}}$.

$$N - FBN (\text{kg N - FBN ha}^{-1}) = (N_{\text{veg}} + N_{\text{grano}}) \times \%N_{\text{dfa}} \text{ (Ecuación 4.5)}$$

En el ELD2, el N-FBN total para los casos donde no se contaba con datos de $\%N_{\text{dfa}}$, se estimó según la relación entre N absorbido y N-FBN (soja; $Y=0,72X-31,8$ $r^2=0,65$ Collino et al., (2015), vicia; $Y=0,88X-58$ $r^2=0,72$ según resultados ELD1)

Se calculó el índice de cosecha de N del sistema (ICN_{sist}) para cada rotación, como la relación entre la sumatoria del N exportado con el grano de todos los cultivos de la secuencia y el N total absorbido de todos los cultivos en el periodo estudiado para ELD1 y ELD2:

$$\text{ICN}_{\text{sist}} = \frac{\sum N_{\text{grano}} (\text{kg N ha}^{-1})}{\sum N_{\text{biomasa total}} (\text{kg N ha}^{-1})} \text{ (Ecuación 4.6)}$$

Se calculó la producción de los granos de los diferentes cultivos en equivalente de glucosa (EG), utilizando los factores de conversión de equivalentes de glucosa para granos de, trigo, arveja, maíz y soja en grano establecidos en 1,35, 1,26, 1,25 y 1,82 kg

e.g./kg de grano, respectivamente (Andrade et al., 2015; De Vries, 1972), para luego determinar la eficiencia del uso de N del sistema (EUN_{sist}). Ésta se determinó como la relación entre la sumatoria de EG de cada rotación y la sumatoria de N total absorbido:

$$EUN_{sist} = \frac{\sum EG \text{ grano } (kg \text{ glucosa eq. } ha^{-1})}{\sum N \text{ absorbido total } (kg \text{ N } ha^{-1})} \text{ (Ecuación 4.7)}$$

Se realizó un balance parcial de N (BP) a escala de sistema para todas las secuencias durante el período estudiado, teniendo en cuenta FBN de biomasa aérea (BP_{BA}) y la FBN total que incluía el N-FBN de estructuras subsuperficiales (BP_{TB}):

$$BP_{BA} (kg \text{ N } ha^{-1}) = (\sum N - FBN \text{ aéreo} + \sum N \text{ fertilizante}) - \sum N \text{ grano} \text{ (Ecuación 4.8)}$$

$$BP_{BT} (kg \text{ N } ha^{-1}) = (\sum N - FBN \text{ Tot} + \sum N \text{ fertilizante}) - \sum N \text{ grano} \text{ (Ecuación 4.9)}$$

Donde $\sum$ N-FBN es la suma de kg N ha^{-1} proveniente de FBN de estructuras aéreas sin raíces ($N_{FBNBAveg}$) y N-FBN total incluyendo raíces (N_{FBNBT}), y $\sum$ N Fertilizantes es el aporte en kg N ha^{-1} aplicado en cada rotación, representando las entradas de N al sistema, y $\sum$ N granos son los kg N ha^{-1} exportados del sistema con los granos cosechados.

4.2.3 Mediciones y determinaciones de suelo

4.2.3.1 Momento de muestreo

En junio de 2016 y 2018, al finalizar el segundo y tercer ciclo de rotación en el ELD1 y previo a la implantación de los cultivos invernales, se realizó el muestreo de suelo en cada parcela para evaluar el efecto de las diferentes secuencias. Se realizaron muestras compuestas en cuatro estratos de profundidad; 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15 y 15-30 cm. Se orearon y tamizaron para que pasaran por un tamiz de 2 mm. Cada muestra compuesta de suelo constó de veinte submuestras para asegurar la exactitud y precisión del muestreo.

En el ELD2, en junio de 2016 se realizó un muestreo en las mismas profundidades previamente mencionadas, y luego de cerrar la secuencia completa de las rotaciones Mz-Trg/Sj, CC/Mz-Trg/Sj (2018) y Mz-Sj-Trg/Sj, Mz-CC/Sj-Trg/Sj (2019).

Las rotaciones Sj-Sj y CC/Sj-CC/Sj, se muestrearon en 2018 y 2019. Los muestreos se realizaron siempre en la misma fase de la rotación.

4.2.3.2 Determinaciones químicas

En todas las muestras y profundidades analizadas se realizaron determinaciones de carbono orgánico total del suelo (COT) mediante el método Walkley y Black, (1934). En las muestras de los primeros estratos (0-3,5 y 3,5-7,5 cm) se realizaron determinaciones de nitrógeno total (Nt) mediante el método semi micro Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973).

En los estratos 0-3,5 y 3,5-7,5 cm, se determinó el C carbono orgánico particulado del suelo (COP), y el nitrógeno orgánico particulado del suelo (NOP), cuantificado en las fracciones por encima del tamiz de 53 μm siguiendo el método de Cambardella y Elliott, (1992), y se determinó el N incubado en anaerobiosis (Nan) (Reussi Calvo et al., 2013).

Se calculó la densidad aparente para cada estrato analizado en cada parcela, por el método del cilindro de volumen conocido (Stengel 1983), sin encontrar diferencias significativas. Los valores promedio de ambos ensayos de larga duración para cada profundidad fueron 0,91, 1,17, 1,19 y 1,21 Mg m^{-3} en 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15 y 15-30 respectivamente, y un resultado ponderado de 1,17 Mg m^{-3} en 0-30 cm (Tabla 4.5 Anexo), mostrando valores inferiores a los máximos establecidos para el normal desarrollo de las raíces de los cultivos (1,4 Mg m^{-3}) en suelos del orden Molisol (Wilson et al., 2013).

Debido a que la determinación de C y N en suelo puede presentar variaciones por cambios en la densidad del suelo causada por las diferentes rotaciones de cultivos, los resultados de COT, COP, Ntot y NOP se corrigieron por masa equivalente (me) del suelo según Carter y Gregorich, (2007).

El pH del suelo se determinó con una suspensión 1:2,5 (suelo/agua desionizada) utilizando un analizador de pH (HANNA pH/ORP Meter).

4.2.4 Análisis de datos

Para cada secuencia de cultivos, se analizaron los efectos de la rotación según análisis de varianza utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo 2013). Los análisis de C y N total acumulados en biomasa y en suelo se analizaron considerando

rotación como factor fijo y repeticiones como factor aleatorio en cada año de muestreo. Luego para probar los efectos entre años, se analizó el conjunto de datos de los dos momentos de muestreo, utilizando como factores fijos rotación, y año y la interacción rotación x año. Se anidó repetición dentro del año como término de error para evaluar el efecto año (Gómez y Gómez, 1984). Las comparaciones de pendientes y ordenadas al origen se realizaron mediante test T-student utilizando el programa GraphPad Prism 6.01.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Condiciones climáticas.

En la figura 4.2 se detallan las precipitaciones acumuladas en los períodos Mayo-Octubre (relevante para cultivos invernales) y Noviembre-Abril (relevante a cultivos estivales), junto a la temperatura media anual de cada campaña agrícola.

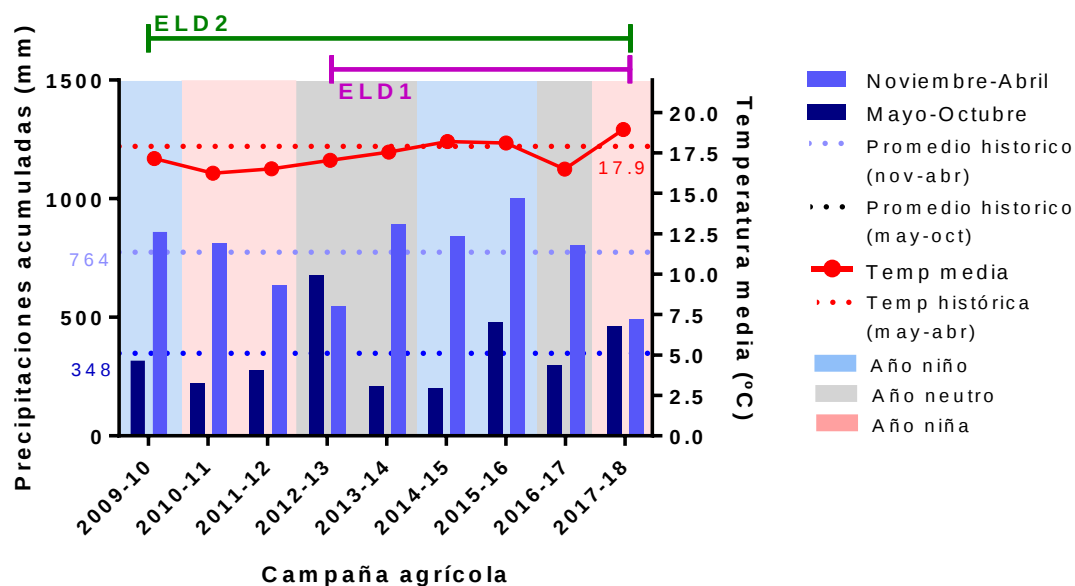


Figura 4.2. Precipitaciones acumuladas (barras) y temperatura media anual (línea) en cada campaña agrícola para los períodos analizados de los ensayos de larga duración (2009-2018, 2012-2018), indicando año climático niño, neutro o niña. Barras azules y celeste indican precipitaciones acumuladas de mayo a octubre y noviembre a abril. Los segmentos verde y violeta representan los períodos para cada ensayo de larga duración (ELD).

Las condiciones climáticas describen los principales factores de incidencia para el normal crecimiento de los cultivos. Las precipitaciones promedio en el período invernal y estival fueron 387 y 761 mm, respectivamente para el ELD1, y 348 mm y 764 mm para el ELD2 (Figura 4.2). En el ciclo completo del ELD1 (2012-2018), ocurrieron tres períodos neutros, dos niños y una niña. Sin embargo, las precipitaciones fueron 32% inferior a lo normal en tres períodos invernales y dos estivales, siendo el resto superior a lo normal, al igual que las temperaturas medias. Mientras que en el período del ELD2, ocurrieron en similares proporciones los años neutros, niño y niña. En dos tercios del período las precipitaciones acumuladas de mayo a octubre fueron 23% inferiores a la normal, pero en el período noviembre-abril fueron 13% superior a lo normal (Figura 4.2).

4.3.2 Ensayo de larga duración 1 (ELD1)

4.3.2.1 Aportes de Carbono y N

Luego de tres ciclos completos de rotación (2012 a 2018), el C acumulado en biomasa total se diferenció entre rotaciones, con mínimos y máximos acumulados que variaron de 23,5 a 48,5 Mg C ha⁻¹ (Figura 4.3). El mayor contenido de C total acumulado se observó en rotaciones que incluyeron maíz, presentando diferencias según antecesor invernal, siendo la rotación intensificada con trigo 12% superior respecto vicia y 27% superior respecto arveja y barbecho, que no presentaron diferencias significativas (38,4 Mg C ha⁻¹). En promedio las rotaciones con maíz acumularon 46% más de C en la biomasa total (42,2 Mg C ha⁻¹) respecto rotaciones con soja de segunda (28,9 Mg C ha⁻¹) (Figura 4.3).

En las rotaciones con soja de segunda (*i.e.* sin maíz) se observó una mayor acumulación de C solo cuando el antecesor fue trigo, siendo 25 y 43% mayor respecto de secuencias que incluían vicia (29 Mg C ha⁻¹) o arveja-barbecho (25,2 Mg C ha⁻¹) (Figura 4.3).

La inclusión de arveja, no demostró diferencias significativas en C total en la biomasa respecto la no inclusión de cultivos invernales (barbecho), mientras que la inclusión de cultivo de trigo y vicia aportaron 20 y 37% más de C respecto el barbecho en rotaciones con maíz y soja de segunda respectivamente.

El C acumulado en granos de rotaciones con maíz fue 1,9 veces superior respecto rotaciones con soja de segunda (8,2 Mg C ha⁻¹). La mayor acumulación de C de granos se logró en rotaciones con trigo (17,1 y 10,5 Mg C ha⁻¹ en rotaciones con maíz y soja de segunda respectivamente), sin diferencias respecto rotaciones con arveja. Por el contrario, la menor acumulación de C en granos se observó en rotaciones con vicia (14,1 y 5,9 Mg C ha⁻¹ en rotaciones con maíz y soja de segunda respectivamente), sin diferencias respecto rotaciones con barbecho (Figura 4.3).

La misma tendencia en los resultados se observaron en C acumulado en la biomasa incluyendo C de raíces. Tanto en rotación con maíz, como con soja de segunda, la inclusión de vicia y trigo demostraron el mayor C de biomasa vegetativa, sin diferencias entre las secuencias con ambos cultivos invernales, pero las rotaciones con maíz acumularon 25% más C en biomasa (30 Mg ha⁻¹) respecto los mismos antecesores con soja de segunda (24 Mg C ha⁻¹) (Figura 4.3).

El C acumulado de la biomasa de raíces representó 11,4 y 9,7 % del C total en rotaciones con maíz y soja de segunda respectivamente, y el 17-20% del C vegetativo en rotaciones con maíz y 13-15% en rotaciones con soja de segunda (Figura 4.3). Los aportes netos de raíces fueron 72% superiores en rotaciones con maíz (4,8 Mg C ha⁻¹), respecto soja de segunda (2,8 Mg C ha⁻¹). Las rotaciones que incluyeron trigo y vicia aportaron 18% más de C subsuperficial respecto arveja y barbecho en rotaciones con maíz y 34% más en rotaciones con soja de segunda. Las rotaciones con arveja no realizaron un aporte significativo de C de raíces respecto rotaciones sin cultivos invernales.

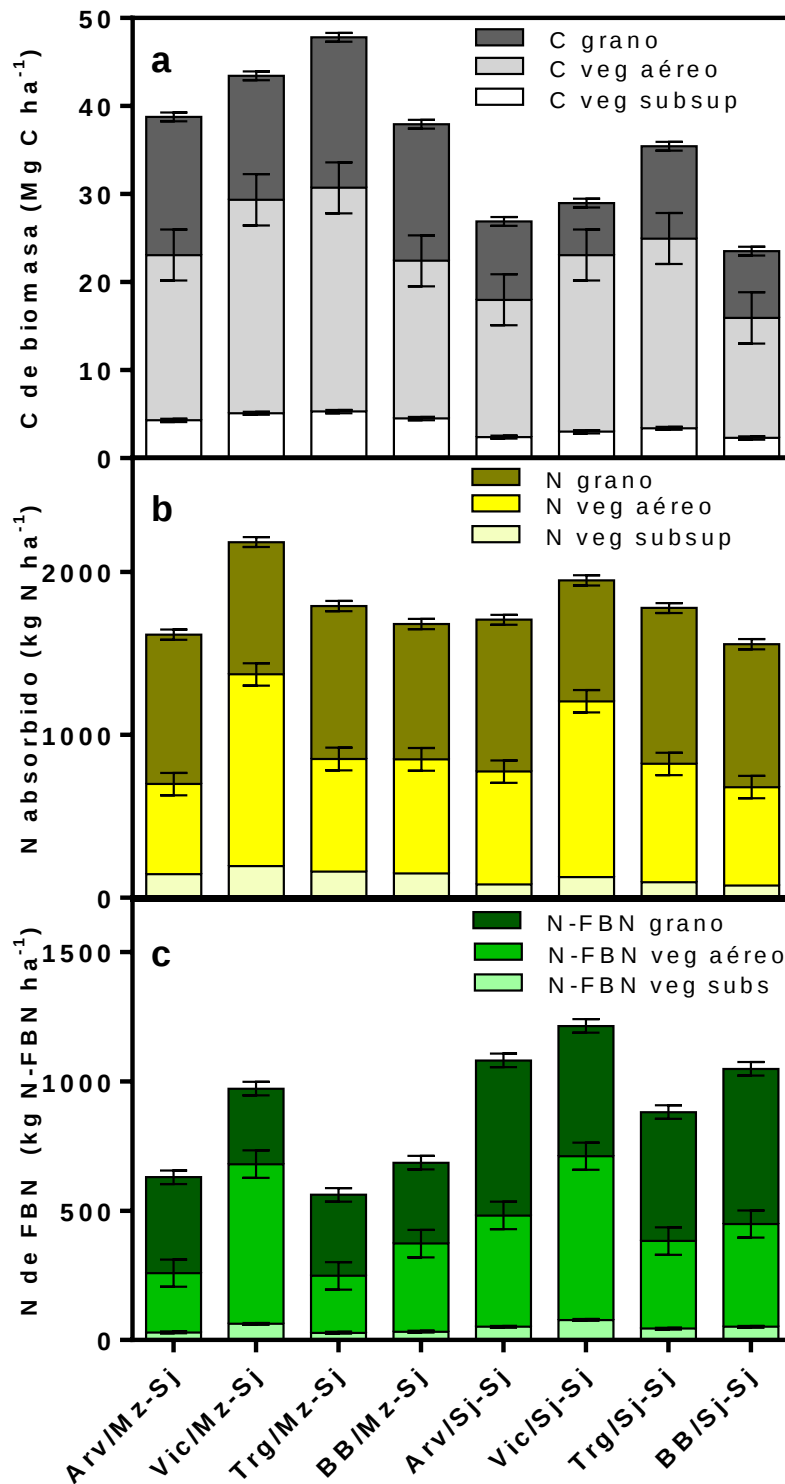


Figura 4.3. a) Carbono acumulado (Mg ha^{-1}), b) N absorbido (kg ha^{-1}) y c) N de fijación biológica (kg N-FBN ha^{-1}) en: biomasa vegetativa subsuperficial (veg subsup), biomasa vegetativa aérea (veg aérea) y biomasa de granos (granos) luego de tres ciclos completos de cada rotación. Los resultados estadísticos del análisis de varianza se muestran en tabla anexa 4.14 y 4.15.

El N exportado con los granos fue en promedio para las rotaciones con arveja y trigo de 936 kg N ha⁻¹, sin diferencias estadísticas con BB/Sj-Sj (877 kg N ha⁻¹), y acumularon 18% más de N en grano respecto a rotaciones con vicia y BB/Mz-Sj (Figura 4.3). En rotaciones con soja de segunda, se observaron los resultados extremos de N acumulado en grano, con mayor extracción en rotaciones con trigo y arveja (944 kg N ha⁻¹), que fueron 27 % superior respecto los menores aportes de vicia (742 kg N ha⁻¹). El promedio de N en grano fue similar en las rotaciones que incluyeron maíz o soja de segunda.

El contenido de N en estructuras vegetativas fue solo estadísticamente mayor en las rotaciones cuando se incluyó vicia como cultivo de cobertura (1288 kg N ha⁻¹), con aporte 64% superiores respecto las restantes rotaciones que promediaron 779 kg N ha⁻¹ (Figura 4.3).

El N subsuperficial acumulado varió de 75 (BB/Sj-Sj) a 194 kg N ha⁻¹ (Vic/Mz-Sj), siendo 71% superior en rotaciones con maíz (162 kg N ha⁻¹), respecto a soja de segunda (95 kg N ha⁻¹) (Figura 4.3). En rotaciones con maíz, estos aportes representaron en promedio 18% del N vegetativo total, mientras que en rotaciones con soja de segunda solo representaron 11%. Los mayores aportes de raíces tanto en secuencias con maíz como con soja de segunda se registraron en rotaciones con vicia, siendo estadísticamente superiores, seguido de trigo y por ultimo arveja y barbecho sin diferencias entre ellos.

El N total acumulado proveniente de FBN varió considerablemente entre rotaciones (561-1214 kg N-FBN ha⁻¹), donde las rotaciones con soja de segunda presentaron 48% más N proveniente de FBN respecto rotaciones con maíz (712 kg N-FBN ha⁻¹) (Figura 4.3). En rotaciones con soja de segunda, la rotación con vicia alcanzo la mayor acumulación de N-FBN (1214 kg N-FBN ha⁻¹), sin diferencias respecto arveja y barbecho (1064 kg N-FBN ha⁻¹), mientras que la rotación con inclusión de trigo presento el menor aporte en secuencias con soja de segunda (881 kg N-FBN ha⁻¹). En las rotaciones con maíz, solo la inclusión de vicia aumento significativamente los aportes de N-FBN, siendo 55% superior respecto de cuando se incluyó arveja, trigo o barbecho (625 kg N-FBN ha⁻¹).

Los aportes anuales promedio de N-FBN vegetativo con raíces de leguminosas invernales fueron significativamente diferente ($p < 0,0001$), con aportes netos promedio (N-FBN vegetativo aéreo + raíces) de arveja de 19 kg N-FBN ha⁻¹, mientras que vicia aportó 121 kg N-FBN ha⁻¹ (Figura 4.3).

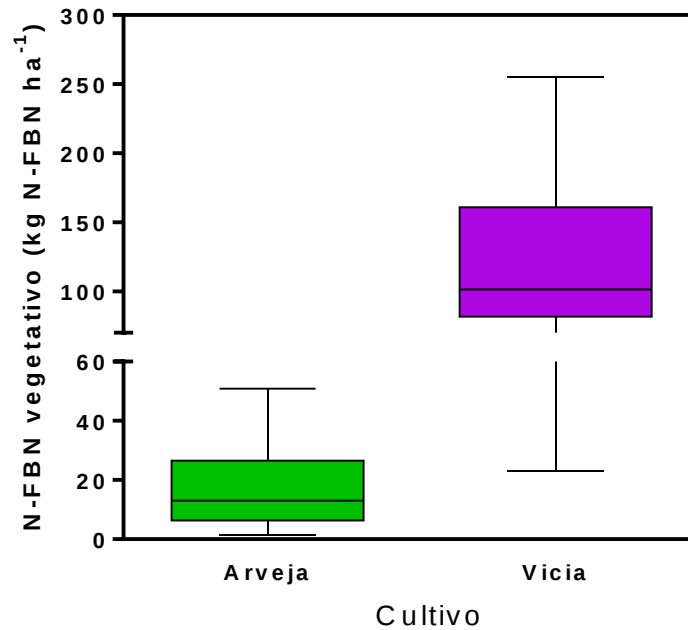


Figura 4.4. Aportes promedio anual de N proveniente de FBN en estructuras vegetativas incluyendo raíces (N-FBN) de arveja y vicia, en rotación con maíz y soja de segunda.

Estos mayores aportes de N del cultivo de vicia se deben a los mayores aportes de biomasa vegetativa, N absorbido y %Ndfa, como fue demostrado también en el capítulo 3 (Figura 3.2). En este capítulo se observa en vicia un requerimiento de 28,6 kg N por Mg de biomasa, similares a los resultados del capítulo 3. Mientras que, los requerimientos de arveja fueron de 23,4 kg N por Mg de biomasa, siendo levemente inferiores a resultados previos. Sumado a esto, el cultivo de vicia demostró mayor acumulación de N proveniente de FBN por cada kg de N absorbido respecto arveja (Figura 4.5b).

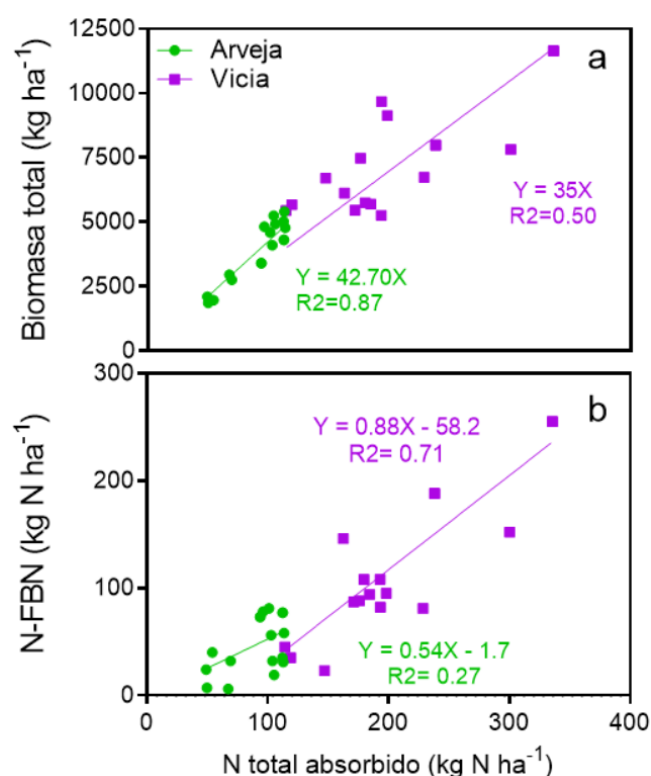


Figura 4. 5. Relación entre a) la biomasa total (incluida la biomasa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad) y la absorción de N para arveja (círculos verdes) y vicia (cuadrados violetas), y b) el N de fijación biológica y la absorción de N. Las líneas discontinuas de las figuras a y b representan la regresión lineal. Ambos cultivos se cultivaron en condiciones de campo en la región pampeana norte de Argentina.

Los aportes acumulados de N de FBN de los cultivos de arveja representaron 23 y 13% de los aportes de FBN totales en rotaciones con maíz y soja respectivamente (Figura 4.6), sin diferencias estadísticas en aportes absolutos entre rotaciones con maíz o soja de segunda (140 kg N ha⁻¹) (Figura 4.4). Vicia aportó 36 y 31% del N-FBN total en rotación con maíz y soja de segunda (Figura 4.6), y al igual que arveja, no presento diferencias en términos absolutos entre las rotaciones que incluían este cultivo (363 kg N ha⁻¹). Los aportes totales acumulados de N-FBN por soja de segunda fueron 417 kg N-FBN ha⁻¹ con antecesor arveja y 363 kg N ha⁻¹, en rotación con vicia y trigo, representando el 39, 30 y 40% de los aportes totales para los antecesores arveja, vicia y trigo, respectivamente (Figura 4.6). Los mayores aportes de N-FBN se debieron a soja de primera, que representó 77 y 64% de aportes totales de N-FBN en rotaciones de arveja y vicia con maíz y el total de los aportes de N-FBN en las restantes rotaciones con maíz (trigo y barbecho). Mientras que, en rotaciones con soja de segunda, el cultivo

de soja de primera aportó 49, 39 y 60% del N de FBN en rotación con arveja, vicia y trigo respectivamente.

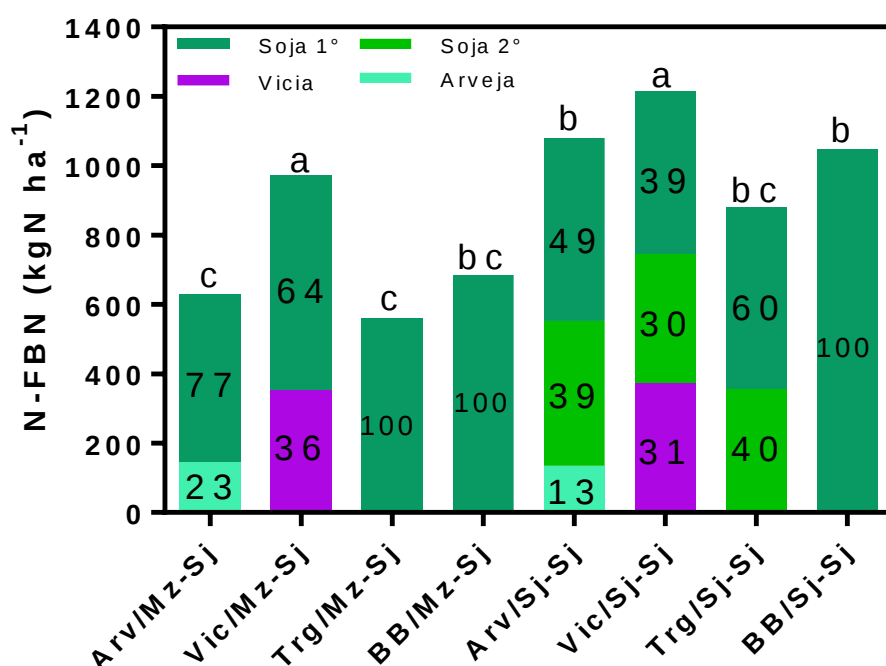


Figura 4.6. Nitrógeno de FBN acumulado (kg N-FBN ha^{-1}) en soja de primera, soja de segunda, vicia y arveja, luego de tres ciclos completos de cada rotación. Valores dentro de barras indican el porcentaje de nitrógeno de fijación biológica que representa cada cultivo de la rotación.

El N-FBN vegetativo incluyendo N-FBN de raíces representó 52% del N-FBN total en rotaciones con maíz y 47% en rotaciones con soja de segunda (Figura 4.3). El promedio de las rotaciones con vicia aportó 90% más N-FBN por aportes de estructuras vegetativas, sin diferencias entre las restantes rotaciones con maíz ($293 \text{ kg N-FBN ha}^{-1}$) y soja de segunda ($438 \text{ kg N-FBN ha}^{-1}$). Las rotaciones con trigo acumularon los menores aportes de N-FBN vegetativo (315 kg N ha^{-1}).

En promedio, el N-FBN proveniente de biomasa de raíces representó el 11% ($47 \text{ kg N-FBN ha}^{-1}$) de los aportes de N-FBN vegetativos totales, siendo 78% mayor en rotaciones con vicia ($70 \text{ kg N-FBN ha}^{-1}$) respecto las restantes rotaciones. Al comparar rotaciones con maíz o soja de segunda, éstas últimas aportaron 47% más N-FBN subsuperficial respecto rotaciones con maíz (63 vs $77 \text{ kg N-FBN ha}^{-1}$, en rotaciones con maíz y soja de segunda respectivamente). Los menores aportes de FBN en raíces se observaron en las rotaciones que incluyeron trigo ($36 \text{ kg N-FBN ha}^{-1}$) (Figura 4.3).

El N proveniente de fertilizantes en base al diagnóstico según el análisis de suelos a la siembra de los cereales fue significativamente diferente entre todas las rotaciones (Tabla 4.6). En rotaciones con maíz, la incorporación de trigo recibió 200% más de aportes respecto vicia, arveja y barbecho (159 kg N ha^{-1}). Mientras que, en rotaciones con soja de segunda, el antecesor trigo fue el único cultivo que se fertilizó con N, y arveja y vicia solo recibieron las dosis de N del PMA que se utilizó como arrancador. Por estas diferencias, en rotaciones con maíz y soja de segunda los mayores aportes de N de fertilizante se registraron con el antecesor trigo, siendo 2,7 y 9,4 veces superior que la media de antecesores vicia y arveja (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Sumatoria de N de fertilizantes (N-fertilizante), sumatoria de aporte total de N al sistema (calculado como la suma de N-FBN + N fertilizante) (Aporte N), índice de cosecha de N del sistema (ICN_{sist}) y eficiencia del uso de N del sistema (EUN_{sist}) para rotaciones del ELD1.

Rotación	N-Fertilizante	Aporte N ¹	ICN_{sist} ²	EUN_{sist} ³
	kg N ha ⁻¹			
Arv/Mz-Sj	148 d	777 d	0,57 a	30,5 a
Vic/Mz-Sj	200 c	1172 ab	0,37 c	20,4 b
Trg/Mz-Sj	463 a	1024 bc	0,53 ab	30,3 a
BB/Mz-Sj	129 e	815 cd	0,49 b	28,9 a
Arv/Sj-Sj	28 f	1109 ab	0,55 ab	18,2 b
Vic/Sj-Sj	28 f	1242 a	0,38 c	11,1 c
Trg/Sj-Sj	261 b	1142 ab	0,54 ab	20,4 b
BB/Sj-Sj	0 g	1048 ab	0,56 a	17,8 b
S.E.	5,2	69,6	0,02	0,95
Rotación	<0,0001	<0,01	<0,0001	<0,0001

Los aportes totales acumulados de N (suma N-FBN total + N fertilizante) variaron de 777 a $1242 \text{ kg N ha}^{-1}$ (Tabla 4.6). Los mayores aportes acumulados totales se observaron en rotaciones con soja de segunda, que fueron 20% superior a los aportes de rotaciones con maíz (947 kg N ha^{-1}), sin embargo, las rotaciones Vic/Mz-Sj y Tr/Mz-Sj no difirieron respecto rotaciones con soja de segunda ($1135 \text{ kg N ha}^{-1}$). La rotación con maíz sin cultivo de invierno y la que incluyó arveja mostraron similares aportes de N, siendo 27% inferiores respecto las restantes rotaciones con maíz.

El ICN_{sist} también presentó diferencias significativas entre las diferentes rotaciones evaluadas, siendo 30% inferior en rotaciones con vicia (0,38), respecto las restantes rotaciones (0,54) (Tabla 4.6). En rotaciones con soja de segunda, no se presentaron diferencia entre antecesores arveja, trigo y barbecho, mientras que en

rotaciones con maíz el mayor ICNsist se registró en rotaciones con arveja y trigo (0,55), que fueron 10% superior respecto el barbecho.

La eficiencia del uso de N del sistema también difirió entre rotaciones, siendo 70% superior en rotaciones arveja, trigo y barbecho con maíz (29,9 kg EG/kgN), respecto las restantes rotaciones. Rotaciones con maíz demostraron una producción 63% mayor de EGgrano por kg N absorbido respecto soja de segunda. Independientemente de rotaciones con maíz o soja de segunda, los antecesores arveja, trigo y barbecho no mostraron diferencias significativas, pero fueron 47 y 67% superiores respecto vicia en rotación con maíz y soja respectivamente (Tabla 4.6).

El balance parcial de N cuando se consideraron solo aportes de estructuras vegetativas aéreas fue 28% inferior respecto el BP_{BT}, aunque presentaron similares tendencias de los resultados.

El balance parcial de N considerando el aporte de raíces luego de tres ciclos completos de la rotación muestra que todos los antecesores en rotación con soja de segunda presentaron resultados positivos (259 kg N ha⁻¹), y fueron 2,6 veces superiores respecto rotaciones con maíz (72 kg N ha⁻¹) (Figura 4.7). Los mayores resultados del balance de N se registraron en rotaciones con vicia (430 kg N ha⁻¹), sin diferencias significativas según cultivo sucesor (maíz o soja de segunda). El BP de vicia en rotación con soja de segunda fue 2,8 veces superior respecto barbecho, arveja y trigo que no difirieron entre sí (178 kg N ha⁻¹). En rotaciones con maíz, los resultados de balance de N presentaron mayor variabilidad, donde la incorporación de vicia y trigo mostraron resultados positivos (360 y 86 kg N ha⁻¹ respectivamente), aunque diferente estadísticamente, mientras que las rotaciones con arveja y barbecho demostraron extracción neta de N del sistema (-78 kg N ha⁻¹). La rotación con arveja alcanzo el menor resultado del balance de N (-140 kg N ha⁻¹), demostrando incluso una mayor extracción respecto la rotación sin cultivo invernal (Figura 4.7).

A pesar de los resultados acumulados de balance de N en cada rotación luego de tres ciclos completos, los aportes promedios por cada ciclo de la secuencia de rotación fueron 24 y 86 kg N ha⁻¹, y en cada año agrícola 12 y 43 kg N ha⁻¹ en secuencias con maíz y soja respectivamente, demostrando una tendencia general con balances levemente positivos.

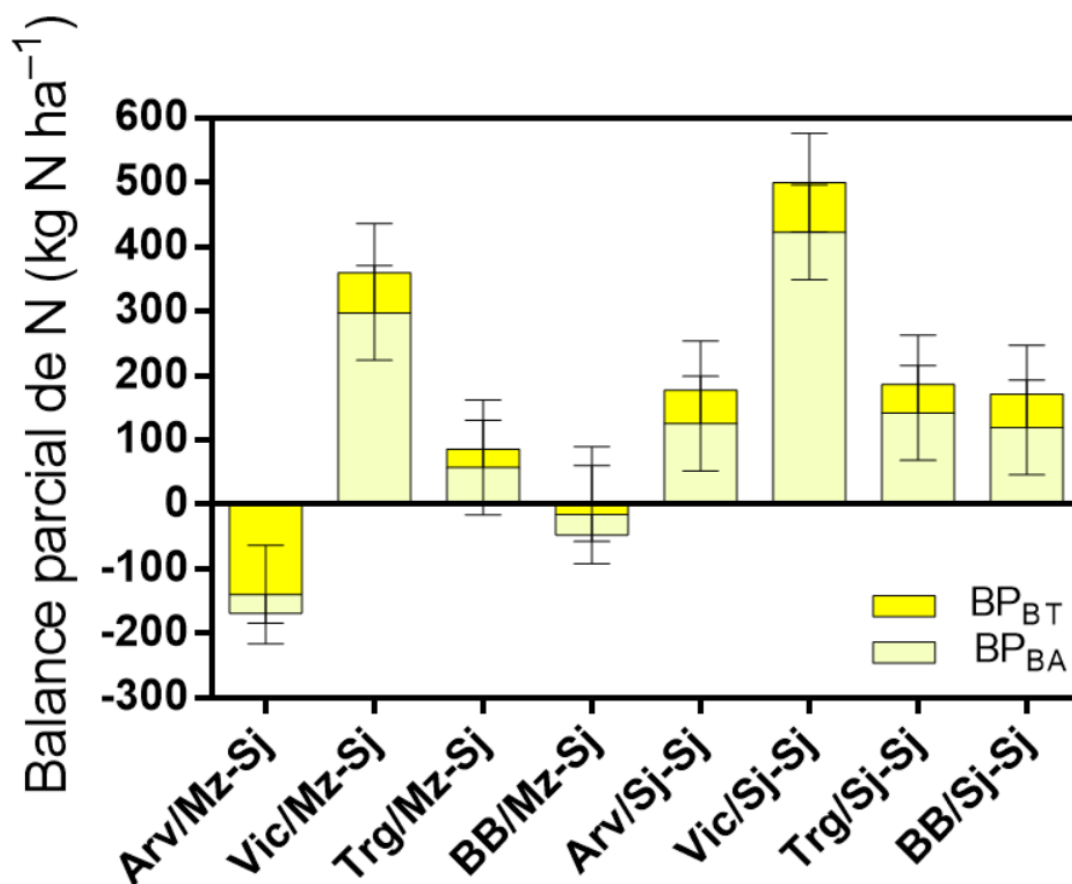


Figura 4.7. Balance parcial de N acumulado (kg N ha^{-1}), en tres ciclos completos de cada rotación considerando el N de biomasa total (BP_{BT}) y el N de biomasa aérea (BP_{BA}). El balance parcial de N se calculó como; ingresos de N al sistema menos la extracción de N en granos.

Los aportes de N al sistema (N-fertilizantes + N-FBN) explicaron el 86% de la variación en los balances de N, observándose un incremento de $1,1 \text{ kg N ha}^{-1}$ en el balance por cada kg N ha^{-1} aportado al sistema (Figura 4.8.a). En cambio, la exportación de N con los granos solo explico el 31% de la variación en el mismo, reduciendo $-1,49 \text{ kg N ha}^{-1}$ el balance por cada aumento de kg N ha^{-1} extraídos en grano (Figura 4.8.b).

Los aportes de N provenientes de N-FBN tuvieron una mayor asociación con el balance de N que el aporte de los fertilizantes, aumentando $0,74 \text{ kg N ha}^{-1}$ en el balance por cada kg N aportado por la FBN ha^{-1} (Figura 4.8.c y d).

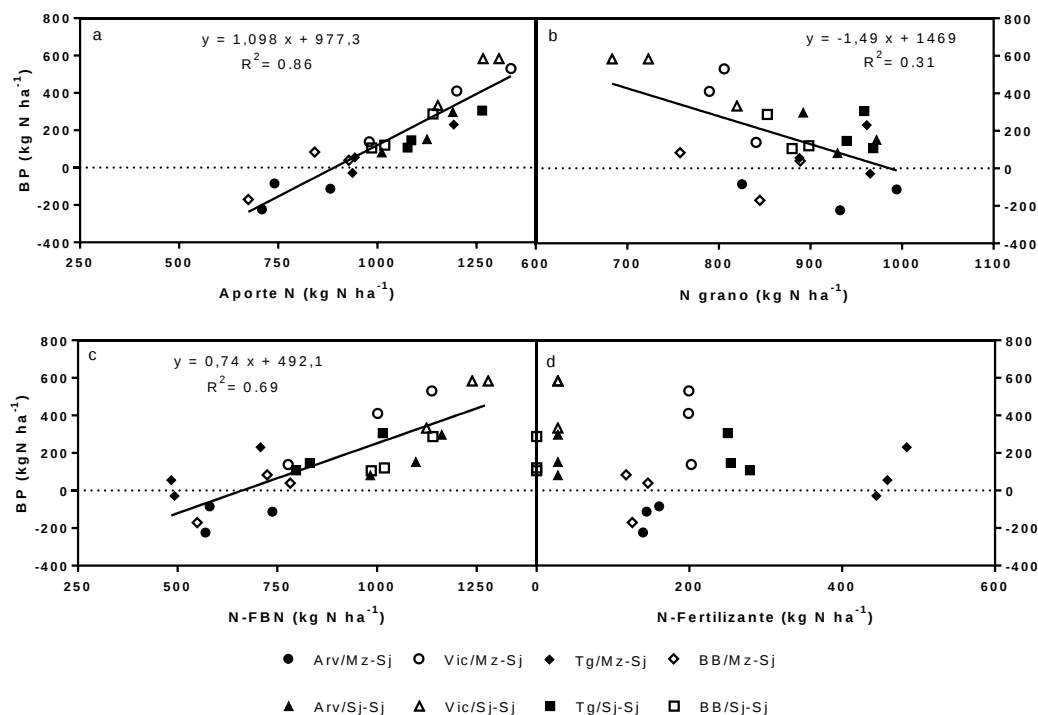


Figura 4.8. Relación entre balance parcial de N acumulado (BP) incluyendo N-FBN subsuperficial y niveles acumulados de: a) Aporte de N (Aporte N), b) N exportado en grano (N grano), c) N de FBN (N-FBN) y d) N de fertilizantes (N-fertilizante). Arveja (Arv), Vicia villosa (Vic), trigo (Trg), barbecho sin cultivo (BB), maíz (Mz) y soja (Sj). Símbolos llenos en rotación con maíz y símbolos vacíos en rotación con soja.

4.3.2.2 Cambios en N total, NOP y Nan en el suelo

El contenido de N total del suelo (expresado en masa equivalente) en 0-3,5 cm fue 13% superior en 2018 respecto 2016 (547 kg N ha⁻¹), y no presentó diferencias entre años en los estratos 3,5-7,5 cm y el acumulado 0-7,5 cm.

El N total del suelo en 2016 fue 547 y 539 kg N ha⁻¹ para las profundidades 0-3,5 cm y 3,5-7,5 cm, sin diferencias entre rotaciones.

Sin embargo, después de 6 años del inicio del experimento, en 2018 se observaron diferencias entre rotaciones solo en el estrato superficial (0-3,5 cm), donde las rotaciones con soja de segunda superaron en 7% el N total del suelo respecto rotaciones con maíz. Las rotaciones con vicia y trigo en secuencias con soja de segunda fueron 13% mayor respecto al resto de las rotaciones (587 kg N ha⁻¹). Similares resultados se observaron también en rotaciones con maíz, donde solo la inclusión de vicia superó en

un 16% las restantes rotaciones con maíz (573 kg N ha^{-1}). En 2018 en la profundidad 3,5-7,5 cm se alcanzó un promedio de N total del suelo de 640 kg N ha^{-1} .

Se observó interacción rotación x año en NOPme al analizar la profundidad de 0-3,5 y 0-7,5 cm. Estas diferencias se debieron principalmente a las diferencias interanuales, donde el NOPme en 0-3,5 de 2018 fue 23% superior respecto 2016 (diferencial $32 \text{ kg NOPme ha}^{-1}$, sin diferencias entre rotaciones). Mientras que el NOPme acumulado hasta 7,5 cm de profundidad, en 2018 fue 14% superior respecto 2016 (0-7,5 cm).

En 2016 no se encontraron diferencias significativas en NOPme entre rotaciones en las dos profundidades analizadas, y tampoco en el acumulado hasta 7,5 cm, con resultados promedio de 142, 47 y $190 \text{ kg NOPme ha}^{-1}$ para 0-3,5, 3,5-7,5 y 0-7,5 cm respectivamente.

En 2018 tampoco se encontraron diferencias significativas entre rotaciones, con promedio de 175, 41 y $216 \text{ kg NOPme ha}^{-1}$ en 0-3,5, 3,5-7,5 y 0-7,5 cm.

El N potencialmente mineralizable no mostró interacción rotación x año, sin embargo, se encontraron diferencias entre años en todos los estratos y entre rotaciones en 0-3,5 y 0-7,5. En 2018, la concentración de Nan fue 31, 23 y 29% superior respecto 2016 para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5 y 0-7,5 cm respectivamente, demostrando aumentos interanuales de 29, 8 y 18 mg kg^{-1} . Estos aumentos se debieron en mayor medida a las rotaciones con vicia, que mostraron aumentos interanuales del 53%, y antecesores de arveja y trigo en secuencia con soja de segunda, que incrementaron 39% el Nan respecto 2016, mientras que las restantes rotaciones solo aumentaron 16%. Las diferencias entre rotaciones, se debieron a que rotaciones son soja de segunda y Vic/Mz fueron 26% superior (116 mg kg^{-1}) respecto las restantes rotaciones con maíz.

La concentración de Nan no presentó diferencias significativas en 2016, con valores promedio de concentración de 93 y 35 mg kg^{-1} en 0-3,5 y 3,5-7,5 cm de profundidad, con una concentración media ponderada para 0-7,5 cm de 62 mg kg^{-1} . En 2018 se observaron diferencias entre rotaciones solo en 0-3,5 cm, donde las rotaciones con soja y Vic/Mz-Sj superaron 37% a las secuencias arveja, trigo y barbecho en rotación con maíz (99 mg kg^{-1}). En rotaciones con soja de segunda, cuando trigo fue el cultivo invernal, el Nan fue 9% superior respecto las secuencias con leguminosas invernales y 21% mayor respecto barbecho. Mientras que, en rotaciones con maíz, la mayor concentración de Nan se obtuvo cuando vicia estaba incluida en la rotación, siendo 43% superior respecto arveja, trigo o barbecho, que no difirieron entre sí. Estas diferencias en el primer estrato de profundidad marcaron las mismas tendencias en el Nan acumulado 0-7,5.

Tabla 4.7. Valores medio y análisis de la varianza para Nitrógeno total (N_{total}me) y nitrógeno orgánico particulado (NOPme), referido a una masa equivalente y nitrógeno potencialmente mineralizable (Nan) para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5 y acumulado a 0-7,5 cm, para las rotaciones: arveja/maíz-soja (Arv/Mz-Sj), vicia/maíz-soja (Vic/Mz-Sj), Trigo/maíz-soja (Trg/Mz-Sj), barbecho/maíz-soja (BB/Mz-Sj), arveja/soja-soja (Arv/Sj-Sj), vicia/soja-soja (Vic/Sj-Sj), Trigo/soja-soja (Trg/Sj-Sj), barbecho/soja-soja (BB/Sj-Sj).

N _{total} me				NOPme			Nan		
Rotación	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5	0-3.5	3.5-7.5	0-7.5	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5
	kg ha ⁻¹			kg ha ⁻¹			mg kg ⁻¹		
2016									
Arv/Mz-Sj	546	558	1104	151	47	198	84	29	55
Vic/Mz-Sj	565	525	1090	170	47	217	94	35	63
Trg/Mz-Sj	537	535	1072	126	48	174	94	39	64
BB/Mz-Sj	525	538	1064	170	46	216	81	33	55
Arv/Sj-Sj	547	532	1079	132	43	174	96	43	68
Vic/Sj-Sj	553	541	1094	129	48	178	89	32	59
Trg/Sj-Sj	554	543	1097	110	45	156	103	37	68
BB/Sj-Sj	546	538	1085	148	54	203	103	31	65
Promedio	547	539	1086	142	47	190	93	35	62
E.E.	10,4	13,4	20,9	17,2	7,3	18,1	9,44	7,3	6,2
Rotación	0,32	0,82	0,87	0,22	0,97	0,24	0,63	0,90	0,66
2018									
Arv/Mz-Sj	591 cd	524	1114	164	44	208	99 d	43	69 c
Vic/Mz-Sj	664 ab	524	1188	193	43	236	142 a	45	90 a
Trg/Mz-Sj	580 cd	675	1255	171	37	208	105 cd	42	71 bc
BB/Mz-Sj	548 d	698	1246	132	42	173	94 d	42	67 c
Arv/Sj-Sj	606 bcd	506	1112	165	41	206	131 ab	40	82 ab
Vic/Sj-Sj	635 abc	702	1337	209	35	244	138 ab	41	86 a
Trg/Sj-Sj	691 a	760	1450	199	41	239	146 a	44	92 a
BB/Sj-Sj	611 bcd	732	1344	164	47	210	121 bc	47	81 ab
Promedio	616	640	1256	175	41	216	122	43	80
E.E.	23,3	94,4	98,3	17,0	5,3	18,1	6,70	2,32	3,75
Rotación	<0,05	0,35	0,26	0,10	0,81	0,20	<0.001	0,59	<0.01
E.E	18,1	67,40	71,09	17,07	6,36	18,09	8,18	5,42	5,13
Rotación	<0,01	0,31	0,23	0,51	0,88	0,52	<0,001	0,96	<0,01
Año	<0,01	0,42	0,21	<0,05	0,10	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01
Rotacion x Año	0,09	0,34	0,26	<0,05	0,97	0,05	0,10	0,78	0,39

En cada profundidad, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según test de diferencia mínima significativa ($p < 0,05$).

4.3.2.3 Carbono orgánico total y particulado del suelo

No se observó interacción rotación x año en las profundidades analizadas y tampoco en el COTme hasta 30 cm. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre años para la mayoría de estratos analizados y diferencias entre rotaciones en 0-3,5 y 0-30 cm.

El contenido de COTme en 2018 fue 13 y 21% superior en 0-3,5 y 15-30 respecto 2016, y 5% inferior en 7,5-15 cm. La variación acumulada de esta variable en 0-30 cm fue 10% superior en 2018 (39,8 Mg COPme ha⁻¹).

Analizando cada año de muestreo, el COTme solo mostró diferencias significativas según rotaciones en el estrato superficial en 2018, y no difirió en los restantes estratos en 2016 y 2018. Los contenidos promedio de COTme fueron 6,32, 5,32, 9,33 y 15,29 Mg ha⁻¹ en 2016 y 7,14, 5,26, 8,86 y 18,54 Mg ha⁻¹ en 2018, para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15 y 15-30 respectivamente.

En 2018, a la profundidad de 0-3,5 cm, la rotación Vic/Mz-Sj presentó el mayor valor de COTme, siendo 17% mayor que las restantes rotaciones con maíz (6,7 Mg ha⁻¹), y sin diferencias respecto rotaciones con soja de segunda (7,2 Mg ha⁻¹).

El COTme acumulado hasta 30 cm en 2018 fue mayor en la rotación Trg/Sj-Sj (42 Mg ha⁻¹), sin diferencias significativas respecto las rotaciones Vic/Mz-Sj y Arv/Mz-Sj (40,8 Mg ha⁻¹), y 6 % superior respecto las restantes rotaciones con soja de segunda (39,6 Mg ha⁻¹). Los resultados en rotaciones con soja de segunda demostraron que la inclusión de vicia o arveja en la rotación no difirió respecto el barbecho, mientras que la cuando trigo estuvo en la rotación el COTme aumentó 5% respecto el barbecho. Por otro lado, la rotación con maíz sin cultivo invernal alcanzo el menor contenido de COTme, siendo 9% inferior respecto las restantes rotaciones con maíz (40,3 Mg ha⁻¹), aumentando 11% y 6% cuando se incorporaron leguminosas y trigo, respectivamente.

Tabla 4.8. Valores medio y análisis de la varianza para carbono organico total (COTme), y carbono orgánico particulado (COPme), referido a una masa equivalente para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15, 15-30 y acumulado a 0-30 (COTme) y 0-7,5 cm (COPme), para las rotaciones: arveja/maíz-soja (Arv/Mz-Sj), vicia/maíz-soja (Vic/Mz-Sj), Trigo/maíz-soja (Trg/Mz-Sj), barbecho/maíz-soja (BB/Mz-Sj), arveja/soja-soja (Arv/Sj-Sj), vicia/soja-soja (Vic/Sj-Sj), Trigo/soja-soja (Trg/Sj-Sj), barbecho/soja-soja (BB/Sj-Sj).

	COTme					COPme		
Rotación	0-3,5	3,5-7,5	7,5-15	15-30	0-30	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5
	Mg ha ⁻¹					kg ha ⁻¹		
2016								
Arv/Mz-Sj	6,4	5,4	9,4	15,2	36,5	1752	554	2306
Vic/Mz-Sj	6,7	5,3	9,1	15,4	36,5	2182	534	2716
Trg/Mz-Sj	6,2	5,4	9,5	14,6	35,6	1651	629	2280
BB/Mz-Sj	5,9	5,3	8,9	15,4	35,5	1947	587	2534
Arv/Sj-Sj	6,4	5,2	9,4	15,0	36,0	1492	532	2024
Vic/Sj-Sj	6,5	5,3	9,0	15,1	35,9	1569	641	2210
Trg/Sj-Sj	6,2	5,3	9,6	16,4	37,6	1444	606	2051
BB/Sj-Sj	6,4	5,2	9,7	15,2	36,5	1882	676	2558
Promedio	6,32	5,32	9,33	15,29	36,27	1740	595	2335
E.E.	0,17	0,09	0,44	0,78	0,87	194,7	90,7	204,4
Rotación	0,17	0,73	0,85	0,84	0,74	0,20	0,92	0,25
2018								
Arv/Mz-Sj	6,9 bc	5,1	9,3	18,9	40,2 abc	1771	434	2206
Vic/Mz-Sj	7,8 a	5,3	9,0	19,2	41,3 ab	2269	477	2745
Trg/Mz-Sj	6,9 bc	5,2	8,8	18,5	39,3 bc	1897	536	2433
BB/Mz-Sj	6,2 c	5,2	8,0	17,3	36,7 d	1643	534	2177
Arv/Sj-Sj	7,1 ab	5,0	8,6	18,3	39,1 c	2048	468	2516
Vic/Sj-Sj	7,2 ab	5,0	8,9	18,8	39,9 bc	2029	485	2514
Trg/Sj-Sj	7,6 ab	5,6	9,2	19,5	42,0 a	2316	437	2753
BB/Sj-Sj	7,3 ab	5,7	9,1	17,8	39,9 bc	2092	621	2713
Promedio	7,14	5,26	8,86	18,54	39,8	2008	499	2507
E.E.	0,26	0,22	0,33	0,77	0,67	231,7	66,3	242,6
Rotación	<0,05	0,24	0,22	0,51	<0,01	0,47	0,55	0,54
E.E.	0,22	0,17	0,39	0,77	0,76	214	79,48	224,3
Rotación	<0,01	0,3	0,24	0,46	<0,01	0,37	0,53	0,36
Año	<0,001	0,52	<0,05	<0,001	<0,001	0,08	0,06	0,15
Rotacion x Año	0,34	0,22	0,93	0,89	0,45	0,24	0,99	0,39

En cada profundidad, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según test de diferencia mínima significativa (p<0,05).

El carbono orgánico particulado en los estratos 0-3,5, 3,5-7,5 y acumulado en 0-7,5 cm no mostro interacción rotación x año, pero si demostró diferencias significativas entre años. En 2018 el COPme fue 15% superior en 0-3,5 cm y 16% inferior en 3,5-7,5 cm respecto 2016, con una diferencia acumulada (0-7,5 cm) de +7,3% en 2018.

El COPme en 0-3,5 cm de profundidad fue 1740 y 2008 kg ha⁻¹ en 2016 y 2018 respectivamente, demostrando un incremento de 268 kg ha⁻¹ en el último ciclo de la secuencia de cultivos analizada.

En 3,5-7,5, el COPme fue 595 y 499 kg ha⁻¹ en 2016 y 2018 respectivamente.

4.3.3 Ensayo de larga duración 2 (ELD2)

4.3.3.1 Aportes de Carbono y N

El carbono aportado por los cultivos en el período analizado (2009-2019) fue significativamente diferente entre rotaciones ($p < 0,0001$), con valores acumulados desde 42 Mg C ha⁻¹ en el monocultivo de soja, hasta 69 Mg C ha⁻¹ para la secuencia CC/Mz-Trg/Sj (Figura 4.9). Las rotaciones Mz-Tr/Sj y Mz-Sj-Tr/Sj fueron 60 y 52% superiores en acumulación de C total respecto monocultivo de soja, con diferencias significativas entre las 3 rotaciones. En todos los casos, las rotaciones que incluyeron CC alcanzaron mayor aporte de C respecto la misma rotación sin incluir CC (3% más en promedio), sin embargo, solo la rotación CC/Sj y Sj-Sj fueron significativamente diferentes entre sí, acumulando 30 % más C de biomasa por la inclusión de CC (Figura 4.9).

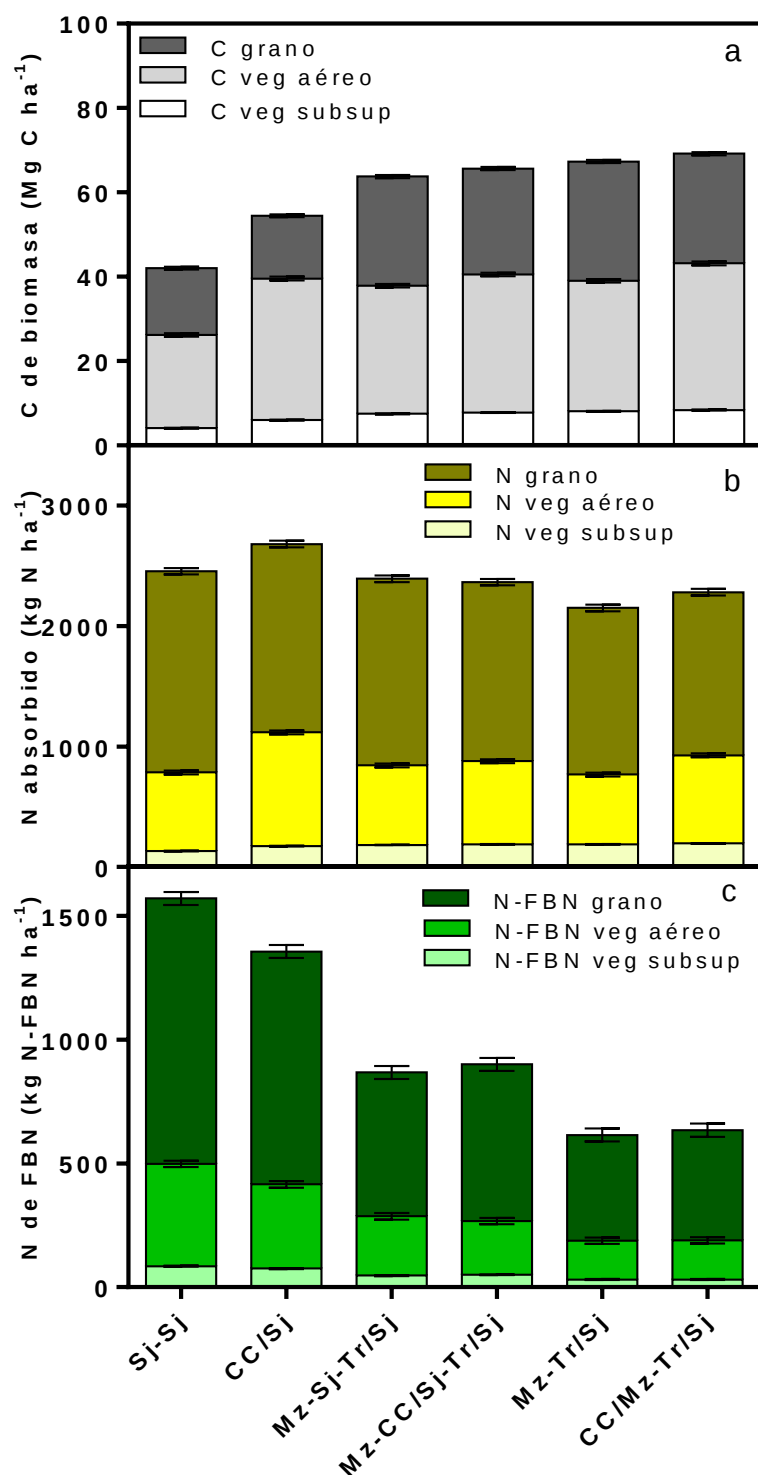


Figura 4. 9. a) Carbono acumulado (Mg ha⁻¹), b) N absorbido (kg ha⁻¹) y c) N de fijación biológica (kg N-FBN ha⁻¹) en: biomasa vegetativa subsuperficial (veg subsup), biomasa vegetativa aérea (veg aérea) y biomasa de granos (granos) luego de diez campañas agrícolas. Los resultados estadísticos del análisis de varianza se muestran en tabla anexa 4.16 y 4.17.

El C de materia seca vegetativa acumulada fue significativamente diferente entre rotaciones ($p < 0,0001$), donde las rotaciones Mz-Sj-Tr/Sj y Mz-Tr/Sj no difirieron entre sí, acumulando 46% más de C en restos vegetativos respecto monocultivo de soja (Figura 4.9). Además, cuando se incluyeron CC en las rotaciones, cada rotación acumuló 51, 7 y 11% más C vegetativo respecto las mismas rotaciones sin CC, *i.e.* Sj-Sj, Mz-Sj-Tr/Sj y Mz-Tr/Sj, respectivamente.

El C acumulado de raíces hasta 30 cm de profundidad representó del 15 al 21% del C vegetativo acumulado, siendo en términos absolutos 4 a 8,5 Mg C ha⁻¹ en el periodo analizado (Figura 4.9). Solo se encontraron diferencias por intensificación en la rotación CC/Sj, que fue 43% mayor respecto monocultivo de soja. Mientras que en las restantes rotaciones no se encontraron diferencias en aportes de C de raíces por la inclusión de CC (Figura 4.9).

El N absorbido total acumulado por los cultivos en el periodo estudiado fue significativamente diferente entre rotaciones, variando desde 2150 a 2670 kg N ha⁻¹ para las secuencias Mz-Trg/Sj y CC/Sj, respectivamente (Figura 4.9). Las rotaciones CC/Sj y CC/Mz-Tr/Sj acumularon mayor N total absorbido (9%) respecto la no inclusión de CC.

El N acumulado en granos representó el 63 % del N absorbido total, y en las rotaciones Sj-Sj y Mz-Tr/Sj fue significativamente diferente respecto la inclusión de CC. En términos generales, la inclusión de CC en estas rotaciones generó menor acumulación de N en grano, siendo significativas estas diferencias solo entre Sj-Sj y CC/Sj (Figura 4.9). El monocultivo de soja acumulo 21% y 8% mayor N en grano, respecto, Mz-Tr/Sj y Mz-Sj-Tr/Sj.

El N remanente en restos vegetativos de los cultivos representó el 38% del N absorbido total. Las rotaciones que incluyeron CC presentaron 27% más N vegetativo respecto las no intensificadas (Figura 4.6).

El N absorbido en raíces represento el 7% del N absorbido total, representando en promedio (179 kg N ha⁻¹), con los menores resultados en monocultivo de soja, que fue 23% inferior respecto CC/Sj y 31% inferior respecto las restantes rotaciones (Figura 4.6).

Como era de esperarlo, la contribución del N proveniente de FBN disminuyó cuando el porcentaje de ocupación de soja en las rotaciones era menor ya que era la única leguminosa en la rotación. De este modo, la acumulación de N-FBN fue mayor en el monocultivo de soja representando 64% del N absorbido total (1570 kg N-FBN ha⁻¹), y fue 16% superior respecto al monocultivo con la inclusión del CC (Figura 4.9). Además, el monocultivo de soja fue un 77 % superior respecto Mz-Sj-Tr/Sj con y sin inclusión de CC que promediaron 889 kg N-FBN ha⁻¹ y 148% mayor que la rotación Mz-Tr/Sj con y sin inclusión de CC que en promedio aportó 632 kg N-FBN ha⁻¹ (Figura 4.9).

El N-FBN en restos aéreos (superficiales y subsuperficiales) explica parte de los ingresos de N al sistema. En promedio representó el 31% del N-FBN total aportado en todas las rotaciones, y solo del 9 al 20% del N absorbido total (Figura 4.9). El N-FBN proveniente de raíces representó el 5% del N-FBN total y 17% del N-FBN vegetativo, aportando 31 a 85 kg N-FBN ha⁻¹ (Figura 4.9).

Tabla 4.9. Sumatoria de N de fertilizantes (N-fertilizante), sumatoria de aporte total de N al sistema (calculado como la suma de N-FBN + N fertilizante) (Aporte N), índice de cosecha de N del sistema (ICN_{sist}) y eficiencia del uso de N del sistema (EUN_{sist}) para rotaciones del ELD2.

Rotación	N-fertilizante	Aporte N	ICN _{sist}	EUN _{sist}
	kg N ha ⁻¹			
S-S	23	1593 a	0,68 a	23 d
CC/S	253	1609 a	0,59 d	20 e
M-S-T/S	446	1313 b	0,65 b	35 b
M-CC/S-T/S	400	1311 b	0,62 c	33 c
M-T/S	689	1303 b	0,64 b	41 a
CC/M-T/S	847	1497 a	0,58 d	35 b
E.E.		39,71	0,003	0,38
		p-valor		
Rotación		<0,001	<0,0001	<0,0001

El ingreso total de N (N-FBN + N-Fertilizantes) difirió entre rotaciones, y fue 20% superior en rotaciones Sj-Sj, CC/Sj y CC/Mz-Tr/Sj, respecto las restantes rotaciones (1309 kg N ha⁻¹) (Tabla 4. 9).

El índice de cosecha de N del sistema difirió entre rotaciones. El mayor valor se observó en el monocultivo de soja (0,68) y fue 16% superior respecto de la misma secuencia con la inclusión de CC (0,59). Las rotaciones Mz-Sj-Tr/Sj y Mz-Tr/Sj promediaron 0,65 y fueron 8% superiores respecto las mismas rotaciones, pero con la inclusión del CC (Tabla 4. 9).

La eficiencia del uso de N en cada rotación fue significativamente diferente, demostrando menores (-12%) EUN_{sist} en rotaciones que incluyen CC (Tabla 4. 9). La mayor EUN_{sist} se observó en la rotación, Mz-Tr/Sj (41 kg EG/kg N abs), que supero en un 17% a la misma rotación intensificada, mientras que el menor resultado fue en CC/Sj (20 kg EG/kg N abs), siendo 13% inferior al monocultivo. Comparando ambos extremos se puede observar que la rotación Mz-Tr/Sj y la inclusión de CC en ésta, tuvieron 76% más EG por kilo de N absorbido respecto monocultivo de soja y su intensificación (Tabla 4. 9).

El balance parcial de N varió desde -282 a 110 cuando se consideraron los aportes de estructuras aéreas, mientras que al incluir los aportes de raíces esos balances ascendieron al rango de -235 a 143 kg N ha⁻¹, y fue diferente entre rotaciones (Figura 4.10).

Al incluir los aportes de raíces, el balance más positivo se observó en la rotación con mayor índice de intensificación (*i.e.* CC/Mz-Tr/Sj), mientras que los valores más bajos se observaron en la rotación Mz-Sj-Tr/Sj y su intensificación con inclusión de CC (-205 kg N ha⁻¹). A pesar de que en la mayor parte de las secuencias los balances fueron negativos, la incorporación de CC mejoró el balance parcial acumulado de N, aumentando; 123 kg N ha⁻¹ en CC/Sj respecto monocultivo, 61 kg N ha⁻¹ en maíz-cc/soja-trigo/soja respecto la rotación sin CC, y 222 kg N ha⁻¹ en cc/maíz-trigo/soja, respecto la rotación no tuvo CC (Figura 4.10).

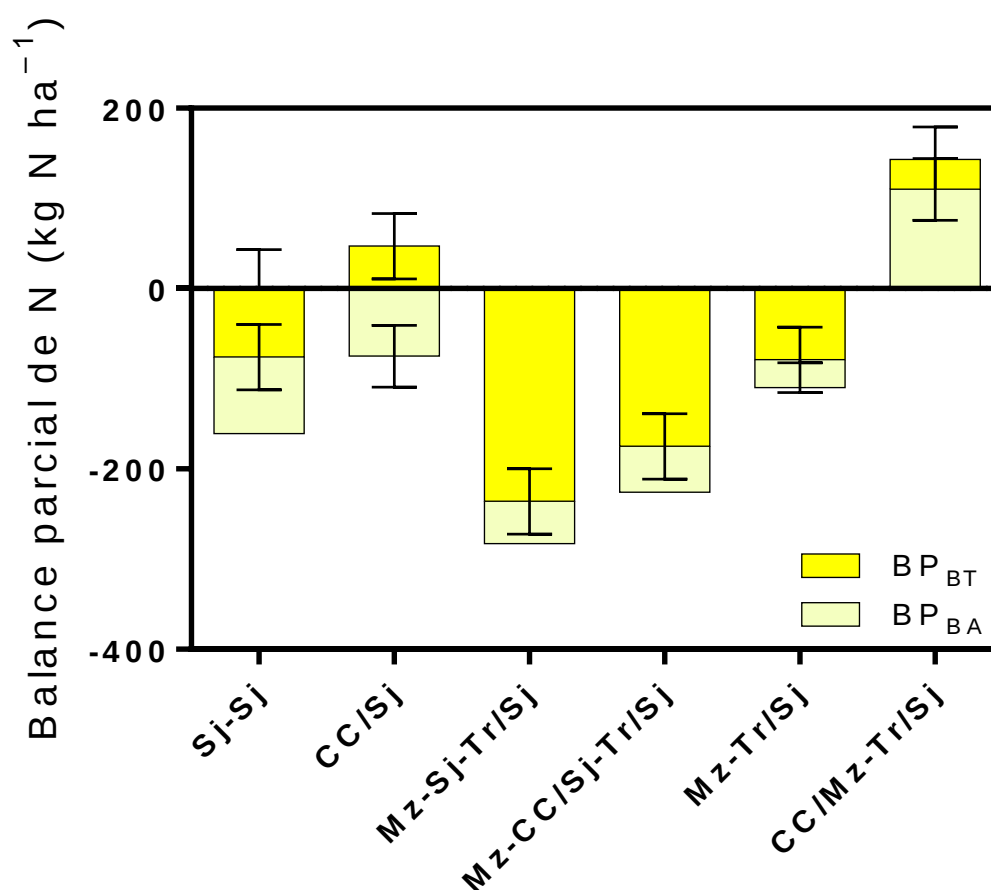


Figura 4. 10. Balance parcial de N acumulado (kg N ha⁻¹), en diez años agrícola considerando el N de biomasa total (BP_{BT}) y el N de biomasa aérea (BP_{BA}). El balance parcial de N se calculó como; ingresos de N al sistema menos la extracción de N en granos.

4.3.3.2 Cambios en N total, NOP y Nan en el suelo

El contenido de N total del suelo (masa equivalente) no mostró interacción rotación x Año, sin embargo, si se observó efecto de rotación, en 0-3,5 cm, donde rotaciones con CC superaron 13% el Ntotal respecto rotaciones sin CC (543 kg Ntotme ha⁻¹). La variación interanual entre los dos años de muestreo (2016 y 2018), muestra una reducción del Ntotme del 10 y 3% para 0-3,5 y 3,5-7,5, siendo estadísticamente significativo en el muestreo superficial. El contenido de N total de las rotaciones Sj-Sj y Mz-Trg/Sj, junto a las mismas rotaciones intensificadas con inclusión de CC fue 607 y 532 kg N ha⁻¹ en 2016 para las profundidades 0-3,5 y 3,5-7,5, acumulando entre ambos estratos 1140 kg N ha⁻¹. Solo en 0-3,5 cm se encontraron diferencias significativas entre rotaciones, donde las secuencias intensificadas con CC acumularon 15% mas Ntotme (649 kg Ntotme ha⁻¹), respecto rotaciones no intensificadas (566 kg Ntotme ha⁻¹).

En 2018 no se encontraron diferencias entre las mismas rotaciones, alcanzando en promedio 547 y 516 kg Ntotme ha⁻¹ en 0-3,5 y 3,5-7,5 respectivamente, con un resultado acumulado a 0-7,5 de 1062 kg Ntotme ha⁻¹.

Además, se observaron diferencias entre rotaciones en 0-3,5 cm, donde rotaciones con CC superaron 13% el Ntotal respecto rotaciones sin CC (543 kg Ntotme ha⁻¹).

Al analizar el NOPme, no se observó interacción rotación x año, ni diferencias entre años, alcanzando en promedio 99 y 38 kg NOPme en 0-3,5 y 3,5-7,5 cm respectivamente. El NOPme acumulado hasta 7,5 cm tampoco mostro diferencias, entre años, alcanzando 141 y 132 kg NOPme ha⁻¹ en 2016 y 2018. Sin embargo, el efecto del factor rotación en 0-3,5 fue significativo, acumulando las rotaciones intensificadas con CC 20% mas NOPme (108 kg NOPme ha⁻¹) respecto las no intensificadas (90 kg NOPme ha⁻¹).

El Nan demostró mayor sensibilidad y variabilidad en cada campaña según rotación. Analizando ambos años de muestreo, se observó interacción rotación x año en 0-3,5 cm, explicado por las diferencias entre rotaciones, por la alta concentración de Nan en rotaciones Sj-Sj y CC/Sj en 2016, que fue superior respecto 2018, mientras las restantes rotaciones aumentaron la concentración de Nan en 2018 respecto 2016. Sin embargo, no se observaron diferencias de Nan entre años en las profundidades analizadas. Entre las rotaciones analizadas en 2016 y 2018, la rotacion CC/Sj demostró la mayor concentración de Nan en ambas campañas, tanto en 0-3,5 como 3,5-7,5. En términos generales las mayores diferencias en concentración de Nan se observaron entre las rotaciones intensificadas con CC sin diferencias entre sí, que fueron superiores respecto las no intensificadas.

Analizando el Ntotme de las rotaciones Sj-Sj, M-S-T/S y las mismas intensificadas con inclusión de CC en 2016 y 2019, no se observó interacción de rotación x año, ni diferencias entre años. Sin embargo, se observaron diferencias entre rotaciones en 0-3,5 cm, donde las rotaciones con inclusión de CC alcanzaron 11% más de Ntotme respecto las no intensificadas.

En 2016 no se encontraron diferencias entre rotaciones en el Ntotme, alcanzando 597, 515 y 1112 kg Ntotme ha⁻¹ en las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5 y acumulado hasta 7,5 cm, respectivamente.

En cambio, en 2019, a pesar de no diferir el N en el estrato superficial según rotaciones (580 kg Ntot), en la profundidad 3,5-7,5, se observaron diferencias entre rotaciones, siendo 14% mayor el N del suelo en CC/Sj respecto de las restantes rotaciones (522 kg Ntotme ha⁻¹). Estas diferencias también se observaron al analizar el Ntotme acumulado hasta 7,5 cm.

No se observaron diferencias significativas en NOPme de cada año o profundidad, así como tampoco difirieron entre años. Los resultados promedio fueron 94 y 36 kg NOPme en 2016, y 83 y 55 kg NOPme en 2018 para 0-3,5 y 3,5-7,5 respectivamente. Solo el NOPme acumulado hasta 7,5 cm de profundidad difirió según rotaciones en 2016, donde las rotaciones Sj-Sj y CC/Sj acumularon 27% más NOPme respecto M-S-T/S y su intensificación.

El Nan demostró interacción rotación x año solo en 0-3,5, observando que no hubo cambios entre rotaciones Sj-Sj y CC/Sj entre años, mientras que la rotación M-S-T/Sj y su inclusión de CC aumentaron 45% en 2018 respecto 2016. En todas las profundidades hubo diferencias entre años, siendo en 2019, 16, 58 y 34% superior la concentración de Nan respecto de 2016, para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, y 0-7,5 respectivamente.

En 2016, en 0-3,5 cm, las rotaciones Sj-Sj y CC/Sj presentaron una concentración de Nan 57% superior respecto M-S-T/S y la inclusión de CC en la misma (74 mg kg⁻¹ de Nan), mientras que en 2019 no se observaron diferencias, alcanzando un promedio de 110 mg kg⁻¹ de Nan. En 3,5-7,5, el valor de Nan de la rotación CC/Sj fue en promedio 46% superior respecto las restantes rotaciones, tanto en 2016 como 2019.

Tabla 4.10. Valores medio y análisis de la varianza para Nitrógeno total (N_{total}me) y nitrógeno orgánico particulado referido a una masa equivalente (NOPme), y nitrógeno potencialmente mineralizable (Nan) para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5 y acumulado a 0-7,5 cm, para las rotaciones: soja-soja (Sj-Sj), CC/soja (CC/Sj), maíz-trigo/soja (Mz-Trg/Sj) y CC/maíz-trigo/soja (CC/Mz-Trg/Sj). Resultados de muestreos de 2016 y 2018.

	N _{total} me			NOP me			Nan		
Rotación	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5
	kg ha ⁻¹			kg ha ⁻¹			mg kg ⁻¹		
				2016					
Sj-Sj	555 c	540	1095	107	37	144	102 b	30 b	64 b
CC/Sj	644 ab	513	1158	104	44	148	130 a	42 a	83 a
Mz-Trg/Sj	576 bc	532	1108	73	34	107	69 c	31 b	49 c
CC/Mz-Trg/Sj	654 a	542	1196	118	47	165	84 c	39 a	60 b
Promedio	607	532	1139	101	41	141	96	36	64
E.E	21,7	19,70	26,6	10,6	5,4	12	4,7	2,0	2,9
Rotación	<0,05	0,74	0,11	0,1	0,4	0,06	<0,001	<0,05	<0,01
				2018					
S-S	516	490	1007	88	30	118	83 c	35 b	57 c
CC/S	585	516	1101	112	39	152	106 a	47 a	74 a
M-T/S	523	519	1042	91	33	124	85 bc	39 ab	61 bc
CC/M-T/S	563	538	1100	95	38	133	96 ab	45 a	69 ab
Promedio	547	516	1062	97	35	132	92	41	65
E.E	18,65	17,62	30	6,95	3,3	7,34	3,8	2,4	3,75
Rotación	0,11	0,38	0,17	0,17	0,3	0,07	<0,05	<0,05	<0,05
E.E	20,22	18,69	28,3	8,98	4,5	9,96	4,2	2,2	2,8
Rotación	<0,01	0,52	<0,05	<0,05	0,1	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001
Año	0,05	0,72	0,07	0,75	0,2	0,44	0,4	0,15	0,23
Rotacion X Año	0,62	0,74	0,89	0,1	0,9	0,09	<0,001	0,89	<0,01

En cada profundidad, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según test de diferencia mínima significativa (p<0,05)

Tabla 4. 11. Valores medio y análisis de la varianza para Nitrógeno total (N_{total}me) y nitrógeno orgánico particulado referido a una masa equivalente (NOPme), y nitrógeno potencialmente mineralizable (Nan) para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5 y acumulado a 0-7,5 cm, para las rotaciones: soja-soja (Sj-Sj), CC/soja (CC/Sj), maíz-soja-trigo/soja (Mz-Sj-Trg/Sj) y maíz-CC/soja-trigo/soja (Mz-CC/Sj-Trg/Sj). Resultados de muestreos de 2016 y 2019.

	N _{total} me			NOP me			Nan		
Rotación	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5
	kg ha ⁻¹			kg ha ⁻¹			mg kg ⁻¹		
2016									
Sj-Sj	555	540	1095	107	37	144 ab	102 b	30 b	64 b
CC/Sj	644	513	1158	104	44	148 a	130 a	42 a	83 a
Mz-Sj-Trg/Sj	581	484	1065	81	29	111 c	74 c	31 b	51 c
Mz-CC/Sj-Trg/Sj	608	523	1131	85	33	119 bc	74 c	25 b	48 c
Promedio	597	515	1112	94	36	131	95	32	61
E.E	22,28	24,14	42,5	7,59	5,1	7,72	4,4	2	2,91
Rotación	0,12	0,49	0,49	0,13	0,3	<0,05	<0,001	<0,01	<0,001
2019									
Sj-Sj	543	505 b	1047 b	83	25	108	101	51 b	74 b
CC/Sj	620	594 a	1213 a	85	40	126	127	68 a	95 a
Mz-Sj-Trg/Sj	553	518 b	1071 b	81	28	109	103	39 b	69 b
Mz-CC/Sj-Trg/Sj	602	543 b	1146 a	84	127	212	111	45 b	76 b
Promedio	580	540	1119	83	55	139	110	51	79
E.E	24,0	13,6	21	6,4	54	55	6,1	3,92	3,22
Rotación	0,16	<0,05	<0,01	0,97	0,5	0,53	0,1	<0,05	<0,01
E.E	23,13	19,58	33,6	7,07	38	39,3	5,3	3,1	3,07
Rotación	<0,05	0,11	<0,05	0,18	0,5	0,56	<0,001	<0,001	<0,001
Año	0,33	0,6	0,81	0,36	0,5	0,77	<0,01	<0,01	<0,01
Rotacion X Año	0,96	0,08	0,52	0,27	0,5	0,39	<0,01	0,1	0,06

En cada profundidad, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según test de diferencia mínima significativa (p<0,05)

4.3.3.3 Carbono orgánico total y particulado del suelo

Analizando los resultados de COTme de ambos momentos de muestreo, no se observó interacción rotación x año, y tampoco diferencias significativas interanuales para cada profundidad analizada. En la profundidad 7,5-15 cm se observó efecto de rotación analizando los resultados de ambos momentos de muestreo, donde el monocultivo de soja no difirió respecto la incorporación de CC, pero fue 10% inferior respecto Mz-Trg/Sj y CC/Mz-Trg/Sj (9,13 Mg COTme ha⁻¹). Al comparar los resultados interanuales, se observa una caída promedio en todas las profundidades del 6% en el COTme del suelo en 2018 respecto 2016.

El COTme del suelo no presentó diferencias entre rotaciones en 2016 cuando se compararon Sj-Sj, CC/Sj, Mz-Trg/Sj y CC/Mz-Trg/Sj, promediando 6,9, 5,7, 9,2 y 14,9 Mg COTme ha⁻¹ para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15 y 15-30 cm respectivamente. En 2018, el promedio de estas mismas secuencias y profundidades fue 6,3, 5,5, 8,4 y 14,3 Mg COTme ha⁻¹, con diferencias significativas por rotaciones solo en la profundidad 3,5-7,5, donde las rotaciones Mz-Trg/Sj y CC/Mz-Trg/Sj fueron 13% mayores respecto monocultivo de soja y la inclusión de CC en la misma.

El COTme acumulado hasta 30 cm de profundidad fue 36,6 y 34,5 Mg COTme ha⁻¹ en 2016 y 2018 respectivamente, sin diferencias entre rotaciones en cada año. El COPme en estas rotaciones no presentó interacción rotación x año ni diferencias entre años, siendo solo estadísticamente diferente por efecto rotación en 3,5-7,5 cm demostrando la misma tendencia en ambos años donde las rotaciones no intensificadas con CC fueron 25% inferiores respecto las que incluyeron CC.

El COPme de 2016 en 0-3,5 y 3,5-7,5, fue 1311 y 545 kg COPme ha⁻¹, respectivamente, sin diferencias significativas entre rotaciones. En 2018 el promedio de estos estratos fue 1538 y 435 kg COPme ha⁻¹, con diferencias significativas entre rotaciones solo en 3,5-7,5, donde el monocultivo de soja fue 40% inferior respecto las restantes secuencias.

Tabla 4.12. Valores medio y análisis de la varianza para carbono orgánico total (COTme), y carbono orgánico particulado (COPme), referido a una masa equivalente para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15, 15-30 y acumulado a 0-30 (COTme) y 0-7,5 cm (COPme), para las rotaciones: soja-soja (Sj-Sj), CC/soja (CC/Sj), maíz-trigo/soja (Mz-Trg/Sj) y CC/maíz-trigo/soja (CC/Mz-Trg/Sj). Resultados de muestreos de 2016 y 2018.

	COTme					COPme		
Rotación	0-3,5	3,5-7,5	7,5-15	15-30	0-30	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5
	Mg ha ⁻¹					kg ha ⁻¹		
2016								
Sj-Sj	6,44	5,55	8,32	14,67	34,99	1408	493	1901
CC/Sj	7,15	5,77	8,93	15,76	37,60	1432	579	2011
Mz-Trg/Sj	6,49	5,79	9,53	15,29	37,11	945	461	1406
CC/Mz-Trg/Sj	7,43	5,60	9,84	13,66	36,52	1458	645	2104
Promedio	6,88	5,68	9,15	14,85	36,56	1311	545	1855
E.E	0,34	0,2	0,4	0,48	1,09	121,6	64,7	147,6
Rotación	0,21	0,78	0,13	0,08	0,42	0,07	0,27	0,06
2018								
Sj-Sj	5,89	5,11 c	8,03	13,82	32,85	1442	293 b	1734
CC/Sj	6,07	5,38 bc	8,36	14,44	34,25	1811	502 a	2312
Mz-Trg/Sj	6,44	5,83 a	8,60	15,16	36,02	1362	433 a	1795
CC/Mz-Trg/Sj	6,65	5,74 ab	8,57	13,78	34,73	1537	512 a	2049
Promedio	6,26	5,51	8,39	14,30	34,46	1538	435	1973
E.E	0,24	0,11	0,25	0,91	1,14	216,2	22,9	227,0
Rotación	0,2	<0,05	0,42	0,69	0,35	0,53	< 0,01	0,34
E.E	0,3	0,16	0,34	0,73	1,11	175,5	48,5	191,4
Rotación	0,07	0,07	<0,05	0,17	0,15	0,11	< 0,01	< 0,05
Año	0,1	0,08	0,08	0,75	0,3	0,14	0,06	0,47
Rotacion X Año	0,4	0,24	0,51	0,74	0,78	0,60	0,35	0,42

En cada profundidad, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según test de diferencia mínima significativa ($p < 0,05$)

Analizando los muestreos de 2016 y 2019 para las rotaciones Sj-Sj y Mz-Sj-Trg/Sj y las inclusiones de CC en éstas, se puede observar que no existió interacción de factores analizados en ninguna profundidad para el COTme. Al igual que el análisis anterior, se observa una caída general del contenido de COTme del suelo al avanzar

los años de agricultura. Sin embargo, solo en 0-3,5 cm ésta caída del COTme fue significativa, representando una disminución de 10%.

Las rotaciones no mostraron diferencias significativas en el COTme en 2016, promediando 6,7, 5,7, 8,8 y 15 Mg COTme ha⁻¹ en las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15 y 15-30 cm respectivamente. Solo en 2019 en la profundidad 3,5-7,5 cm se observaron diferencias entre rotaciones, demostrando que las rotaciones intensificadas con CC alcanzaron 11% más COT acumulado en suelo respecto las rotaciones que no incluyeron CC (5,27 Mg COTme ha⁻¹). El promedio de COTme alcanzado en 2019 fue 6,0, 5,6, 8,7 y 15,6 Mg COTme ha⁻¹ para 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15 y 15-30 cm respectivamente. El resultado promedio acumulado de COT hasta 30 cm fue 36,2 y 35,8 Mg COTme ha⁻¹ en 2016 y 2019.

No se encontró interacción Rotación x año en las rotaciones analizadas en 2016 y 2019, así como tampoco difirieron entre años. Sin embargo, en 3,5-7,5 se observaron diferencias entre rotaciones.

El COPme 2016 mostro diferencias significativas en 0-3,5 cm, donde las rotaciones Sj-Sj y CC/Sj fueron 21% superior respecto Mz-Sj-Trg/Sj y la inclusión de CC (1170 kg COPme ha⁻¹). Similares diferencias se observaron en la masa acumulada de COP hasta 7,5 cm, que promedio entre las secuencias de cultivos 1761 kg COPme ha⁻¹, mientras que en 3,5-7,5 el promedio fue 466 kg COPme ha⁻¹.

En 2019 solo se encontraron diferencias entre rotaciones en 3,5-7,5 cm, siendo la rotación CC/Sj 71% superior respecto las restantes rotaciones (332 kg COPme ha⁻¹). El promedio de COPme en este año fue 1182 y 391 para 0-3,5 y 3,5-7,5 cm.

Tabla 4. 13. Valores medio y análisis de la varianza para carbono orgánico total (COTme), y carbono orgánico particulado (COPme), referido a una masa equivalente para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15, 15-30 y acumulado a 0-30 (COTme) y 0-7,5 cm (COPme), para las rotaciones: soja-soja (Sj-Sj), CC/soja (CC/Sj), maíz-soja-trigo/soja (Mz-Sj-Trg/Sj) y maíz-CC/soja-trigo/soja (Mz-CC/Sj-Trg/Sj). Resultados de de 2016 y 2019.

	COTme					COPme		
Rotación	0-3,5	3,5-7,5	7,5-15	15-30	0-30	0-3,5	3,5-7,5	0-7,5
	Mg ha ⁻¹					kg ha ⁻¹		
2016								
Sj-Sj	6,44	5,55	8,32	14,67	34,99	1408 a	493	1901 a
CC/Sj	7,15	5,77	8,93	15,76	37,60	1432 a	579	2011 a
Mz-Sj-Trg/Sj	6,32	5,63	8,75	14,26	34,95	1127 ab	372	1498 b
Mz-CC/Sj-Trg/Sj	6,78	5,83	9,23	15,31	37,15	1214 b	421	1635 b
Promedio	6,67	5,70	8,81	15,00	36,17	1295	466	1761
E.E	0,31	0,17	0,28	0,77	1,39	66,95	74,6	67,35
Rotación	0,32	0,64	0,25	0,56	0,44	<0,05	0,32	<0,01
2019								
Sj-Sj	5,64	5,28 b	8,65	16,17	35,74	1105	301 b	1406
CC/Sj	6,50	6,13 a	8,63	15,93	37,19	1218	567 a	1785
Mz-Sj-Trg/Sj	5,71	5,27 b	8,52	14,24	33,73	1186	360 b	1546
Mz-CC/Sj-Trg/Sj	6,06	5,59 ab	9,01	16,06	36,71	1217	334 b	1551
Promedio	5,98	5,56	8,70	15,60	35,84	1182	391	1572
E.E	0,2	0,16	0,22	0,75	0,99	101,6	55,1	147,8
Rotación	0,08	<0,05	0,49	0,31	0,17	0,84	<0,05	0,41
E.E	0,26	0,17	0,25	0,76	1,21	86,8	65,6	114,9
Rotación	<0,05	<0,05	0,13	0,2	0,09	0,30	<0,05	<0,05
Año	<0,05	0,63	0,61	0,73	0,86	0,39	0,13	0,23
Rotacion X Año	0,98	0,17	0,6	0,75	0,88	0,17	0,49	0,16

En cada profundidad, letras diferentes indican diferencias entre tratamientos según test de diferencia mínima significativa ($p < 0,05$)

4.4 DISCUSION

En los sistemas productivos argentinos, durante las últimas décadas, se generalizó la adopción de sistemas de cultivo simplificados con soja, como consecuencia de los beneficios económicos y tecnológicos de la implementación del cultivo de soja transgénico (Novelli et al., 2023). Asociado a esto, se produjeron drásticas reducciones de los aportes de materia orgánica (fuente de C y N por

mineralización de residuos), por la menor superficie cultivada con cereales, que sumado a los deficientes niveles de fertilizantes utilizados, derivaron en balances de nutrientes negativos. Koritschoner et al., (2023) demostraron que, debido a estos bajos niveles de fertilización en la región pampeana, sin lograr abastecer la demanda de los cultivos (incluso utilizando cultivos que fijan N atmosférico), la elevada productividad que caracteriza a ésta región se alcanza a expensas del agotamiento de los nutrientes del suelo.

Las estimaciones de pérdidas de N en la región pampeana, para la mayoría de los sistemas productivos se calculan en aproximadamente $-25 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Díaz de Astarloa y Pengue, 2018; Viglizzo et al., 2011). Con resultados similares Koritschoner et al., (2023) estimaron pérdidas promedio de N de $-22,4 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (2012-2019), siendo superiores en la región núcleo ($-31 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), donde los cultivos de soja y maíz representaron el 61 y 24% de éstas pérdidas de N, respectivamente.

Sin embargo, la mayoría de los estudios han cuantificado los balances de N como la sumatoria de los resultados en cada cultivo, sin tener en cuenta los diferentes resultados que se podrían obtener en los balances de N, cuando se evalúan las diferentes secuencias de rotación (Liu et al., 2016), pudiendo la combinación de distintos cultivos tener efectos sinérgicos o antagónicos sobre el balance de N. Por estos motivos se estudió la respuesta de los balances parciales de N en rotaciones intensificadas por la inclusión de diferentes CC o grano durante los períodos de barbecho.

Cafaro La Menza y Carciochi, (2023) mostraron que los mayores beneficios de incluir gramíneas como CC estuvo relacionado con la mejora en el stock de C en suelos, mientras que la inclusión de leguminosas que aportan N beneficiarían a los cultivos siguientes por una rápida mineralización de los residuos. Por otro lado, también se ha demostrado que rotaciones que incluyen mayor cantidad de cultivos, con proporciones balanceadas entre gramíneas y leguminosas mejorarían los balances de N respecto el monocultivo de soja, aunque éstos podrían seguir siendo negativos (Novelli et al., 2023).

Los resultados de este trabajo demostraron rangos de balances parciales acumulados en 6 años de -140 a 500 kg N ha^{-1} (ELD1) y en 9 años -236 a 143 kg N ha^{-1} (ELD2). En ambos experimentos el balance anual de N de las rotaciones experimentadas mejoraron ampliamente las pérdidas estimadas en la bibliografía citada según rotaciones implementadas por productores, promediando 28 y $-7 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ en ELD1 y ELD 2 respectivamente. Solo las rotaciones Arv/Mz-Sj (ELD1) y Mz-Sj-Tr/Sj (ELD2) presentaron pérdidas anuales de N ($-24,8 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) similares a las estimadas en trabajos previos. Estos resultados de balances anuales de N corroboran la primera hipótesis, refiriendo que rotaciones con mayor proporción de leguminosas en las secuencias presentaron balances de N más positivos (Fig. 4.11 b).

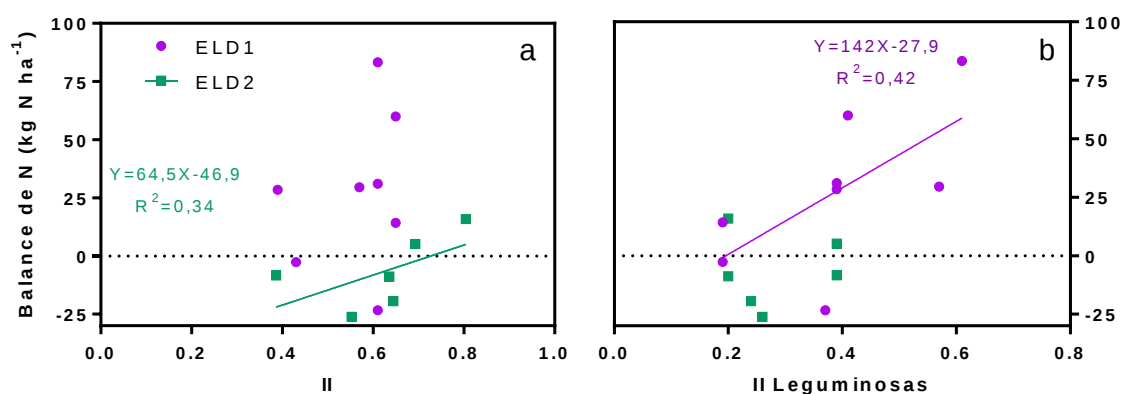


Figura 4. 11. Balance parcial de N anual para resultados de ensayo de larga duración 1 (ELD1) y 2 (ELD2), en función de: a) el índice de intensificación de cultivos (II) calculado como la relación entre días de ocupación con cultivo por año, y b) el índice de intensificación de leguminosas (II Leguminosas), calculado como la relación entre días de ocupación de leguminosas y días totales con cultivos en la rotación.

Esta tendencia creciente en los aportes anuales de N respecto al índice de intensificación de leguminosas se observa en ambos experimentos. Sin embargo, en el ELD2 no se observó ajuste significativo de la regresión respecto al II leguminosas (Figura 4.11 b), posiblemente debido a que presentan baja ocupación de leguminosas en la rotación. Sin embargo, demostraron relación entre el balance de N y el II de cultivos (Figura 4. 11 a). Por el contrario, los resultados del ELD1 que exploran un mayor rango de II leguminosas, no demostraron asociación con el II de cultivos (Figura 4. 11 a), pero demostraron que el balance parcial aumenta +1 kg N ha⁻¹ año⁻¹ por cada 0.006 de aumento del II de leguminosas, es decir +14,2 kg N ha⁻¹ año⁻¹ por cada unidad decimal de aumento en II leguminosas (Fig. 4.11). Iannetta et al., (2016) demostraron que la contribución de la FBN al balance de N alcanzó un máximo nivel cuando la fracción de leguminosas en la rotación fue del 50%. Mientras que, Novelli et al., (2023) demostraron que los ingresos totales de N en secuencias de rotación, se correlacionaron con el II de cada secuencia, y los ingresos provenientes de FBN se relacionan con el porcentaje de leguminosas en la secuencia. Estos resultados concuerdan con este trabajo, demostrando que los ingresos totales de N explicaron en mayor medida los resultados del balance de N, siendo el N-FBN de mayor importancia respecto N-fertilizante (Figura 4.6 a, c, d).

Otros trabajos (Martínez et al., 2022; Novelli et al., 2023) han demostrado que, dependiendo las condiciones de cada suelo; como los niveles iniciales de materia

orgánica, los niveles de fertilización nitrogenada, o diferencias entre ordenes de suelos, las respuestas a los balances de N pueden diferir. A pesar de estas diferencias según propiedades de suelos, existe un gran consenso respecto que los valores del balance de N alcanzado dependen de los niveles de producción de biomasa de cultivos alcanzado y la dinámica de mineralización/inmovilización de los nutrientes al momento del muestreo. En los experimentos de este trabajo, los muestreos se realizaron posterior a un mismo cultivo en cada rotación para atenuar posibles efectos de cultivo antecesor y en condiciones de suelo similares, amortiguando posibles diferencias en las condiciones de suelo entre tratamientos y experimentos.

Los aportes de N-FBN presentan gran variabilidad dependiendo si la intensificación con inclusión de cultivos de leguminosa se realiza con cultivos de cobertura o grano. En el ELD1, tanto en rotaciones con maíz, como con soja de segunda ocupación, los aportes totales de N de FBN al sistema (Σ NVeg-FBN) fueron superiores en rotaciones con vicia, respecto arveja. Esto confirma la segunda hipótesis planteada, afirmando que la inclusión de leguminosas invernales como cultivo de cobertura aportan más N proveniente de FBN al sistema que la inclusión de cultivo leguminosas de grano invernales. Los aportes de estos dos cultivos se encontraron dentro del rango de valores informado por Enrico et al., (2020). Respecto los resultados de arveja, otros autores demostraron aportes de N-FBN en restos vegetativos (e.i. balance de N) de aproximadamente 10 a 40 kg N ha⁻¹ (Evans et al., 2001; Walley et al., 2007), similares a los hallados en este trabajo. Debido a estas amplias diferencias de aportes entre leguminosas invernales, existe un amplio consenso entre investigaciones recientes que exploraron en mayor proporción la inclusión de vicia como CC, afirmando que vicia es la alternativa de CC invernal con mayor capacidad de aportar N respecto otros CC (Cafaro La Menza y Carciochi 2023; Enrico et al., 2020; Gabriel et al., 2016; Piva et al., 2021). En este trabajo se demuestra, además, que los aportes de vicia y arveja no difirieron según sean rotados con maíz o soja de segunda ocupación.

A causa de los menores aportes de N-FBN del cultivo de arveja y a la extracción de N en granos, la inclusión de ésta leguminosa no logró aportar N adicional al balance de N del sistema respecto la no inclusión de cultivos invernales, tanto en rotaciones con maíz como soja de segunda. Por lo tanto, en ambas secuencias de cultivos (con maíz o soja de segunda), el cultivo de arveja y la no inclusión de cultivo invernal (barbecho invernal) presentaron similares aportes de N proveniente de FBN, y aportes totales de N, resultando en similares balances parciales de N. Debido a ello, se rechaza la tercera hipótesis, al comprobar que el cultivo de arveja como leguminosa de grano no aporta una mayor contribución de N-FBN al sistema respecto rotaciones sin cultivos invernales. Esto se debe a que, a pesar de presentar un cultivo extra con arveja, los balances

promedios cercanos a la neutralidad de este cultivo (19 kg N ha^{-1}), son compensados por los beneficios de siembra tempranas de los cultivos estivales en las rotaciones con barbechos sin cultivos. En rotación BB/Mz-Sj, el maíz requirió menor fertilización nitrogenada por la mayor mineralización de N durante el barbecho, y por los mayores requerimientos en rotación Arv/Mz-Sj dada la extracción de N en la biomasa de arveja. Mientras que en rotación BB/Sj-Sj, el cultivo alcanzó mayor biomasa y N-FBN. Nuevamente, estos aportes de N-FBN explicaron en mayor proporción los mayores resultados del balance parcial de N (Figura 4.6.a). Mientras que, el mayor requerimiento de N de fertilizante en la rotación Arv/Mz-Sj respecto BB/Mz-Sj, no redujo las brechas en los balances entre estas rotaciones.

A pesar de no diferir en los balances de N, las rotaciones que incluyeron arveja como cultivo de grano alcanzaron mayores EUN respecto barbechos, demostrando una mayor productividad del nutriente. Este mayor aprovechamiento del nutriente sumado a balances de N similares hace que la rotación Arv/Sj-Sj siga siendo una buena alternativa como planteo de intensificación de rotaciones. Además, aporta una cosecha extra de grano, con los beneficios económicos y productivos correspondientes, pudiendo reducir posibles pérdidas de N por lixiviación (Abdalla et al., 2019) y permitiendo un mayor reciclado de nutrientes por una rápida mineralización de residuos de baja C/N que aportan nutrientes al cultivo de grano siguiente (Restovich et al., 2012).

La inclusión de diferentes CC, demostró diferencias en los balances parciales de N en el ELD1, por lo tanto, podrían verse modificados los aportes de biomasa de los cultivos, y en consecuencia los aportes de COT y N_{tot} al suelo. En este trabajo, se encontraron diferencias entre rotaciones en el ELD1 para las variables del suelo a partir del sexto año (2018), donde por cada kg N acumulado en el balance, el COT aumentó 2,98 y 1,49 kg de COT ha^{-1} en 0-30 y 0-3,5 cm respectivamente, y el N_{tot} aumento 0,14 kg ha^{-1} en 0-3,5 cm (Figura 4.12).

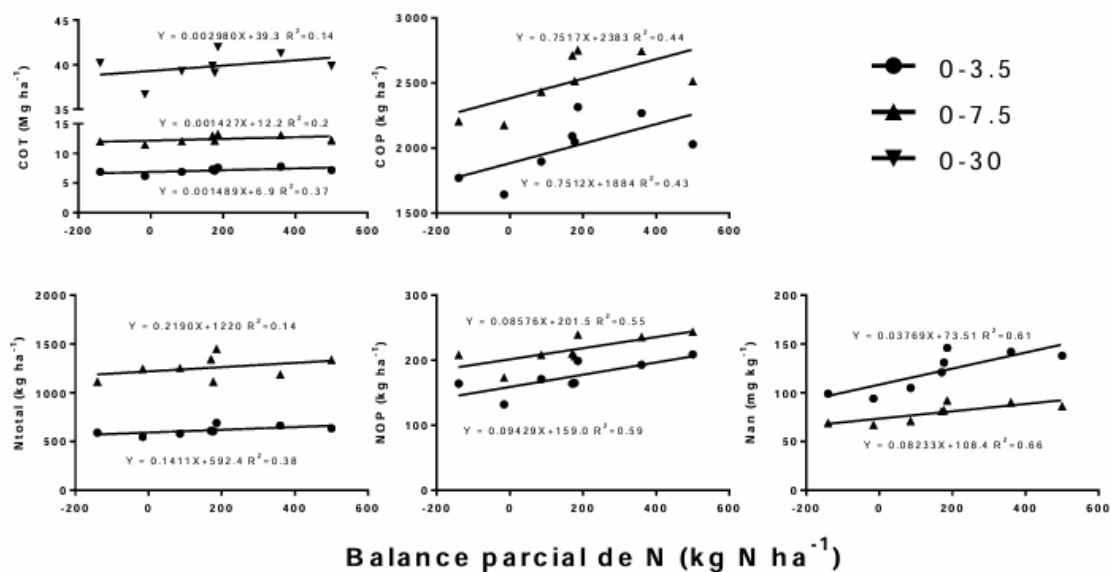


Figura 4.12. Relación entre balance parcial de N acumulado (BP) y niveles finales (2018) de variables de suelo: A) carbono orgánico total (COTme), B) carbono orgánico particulado (COPme), C) nitrógeno total (Ntotalme), D) nitrógeno orgánico particulado (NOPme), y E) nitrógeno potencialmente mineralizable en anaerobiosis (Nan).

Por lo tanto, no se rechaza la cuarta hipótesis, demostrando que los aportes adicionales de N en los balances del sistema, permitieron incrementar los contenidos de COT, NOT, y NOP del suelo. No existen trabajos en la región pampeana que hayan analizado el efecto a largo plazo de balance de N de la biomasa de cultivos incluyendo aportes subsuperficiales sobre los niveles de C y N del suelo. Estos resultados muestran las relaciones positivas entre los aportes acumulados de biomasa y C y N del suelo, demostrando mejores asociaciones en estrato superficial (0-3,5 cm) respecto el acumulado 0-7,5 y 0-30 cm de profundidad (Figura 4.12). Estos mayores grados de respuestas solo en los estratos superficiales también fueron destacados por Crespo et al., (2021b), y Fontana et al., (2021), demostrando además este último, que adecuados niveles de nutrición del CC aumentan los aportes de COS. .

En línea con estos resultados, Jian et al., (2020) demostraron por medio de revisión bibliográfica, que la inclusión de CC aumentó 15,5% el COS en los primeros 30 cm, estando la biomasa de los CC correlacionada positivamente y la relación C/N de los residuos negativamente con los cambios en el COS. Esto demostraría al igual que en este trabajo, que el aumento de la intensificación de secuencias de cultivos, con aumento de frecuencia de leguminosas en rotación, permitiría aumentar la reposición de C del suelo. Melchori et. al., (2014) demostraron que en monocultivos de maíz no fue posible incrementar los stocks de C del suelo por aumentos en aportes de N (aunque en este caso por aportes de N de fertilizantes), debido a que la reducción de la relación

C/N de residuos aceleraría la descomposición de estos durante el largo período de barbecho, exponiéndolos a la pérdida de C del suelo por respiración microbiana. Esto permite destacar la importancia de los CC, por los aportes extra de nutrientes, reciclado de los mismos, y la combinación de residuos de diferente composición. En la región pampeana (Alvarez et al., 2017) encontraron aumentos medios del 20% del COS (0-20 cm) en experimentos con incorporación de gramíneas como CC, y se registraron pérdidas de COS solo en experimentos de menos de 5 años de antigüedad.

Los resultados de este trabajo muestran que, al momento del muestreo final de suelo, la inclusión de cultivos invernales respecto el barbecho, mostró incrementos promedios de 10% y 1% en COT 0-30 en rotaciones con maíz y soja de segunda respectivamente, aunque fueron mayores en termino absoluto los aumentos en rotaciones con soja de segunda. A pesar de no disponer de datos iniciales al momento de inicio del experimento, no podemos afirmar que estas variaciones representen aumento netos respecto la condición inicial, como fue demostrado por Crespo et al., (2021 b). Mientras que el Ntot en 0-3,5 cm fue 12 y 5% superior en rotaciones con maíz o soja de segundo respecto la no inclusión de cultivos invernales.

Las fracciones lábiles de COP y NOP, demostraron ser indicadores más sensibles a los cambios de C y N en suelo (Tabla 4.12 Anexos), explicando en mayor proporción la variabilidad de los cambios en estos parámetros según diferencias en aportes de N de residuos, y demostrando que éstos son indicadores tempranos de los efectos de las prácticas de manejo sobre la dinámica del N (Fabrizzi et al., 2003). El Nan también es un indicador sensible a prácticas de manejo (Fabrizzi et al., 2003; Liebig et al., 2004; Reussi Calvo et al., 2014), y a los cambios del NOP y N total del suelo (Gregorutti et. al., 2014), permitiendo estimar los potenciales cambios en la mineralización del N. En estos resultados la mayor concentración de Nan se vio positivamente asociado a los mayores aportes de N del balance (Tabla 4.12 suplementaria), traducándose en menores requerimientos de N de fertilizantes para los cultivos de gramíneas siguiente.

En la región pampeana, Crespo et al., (2021a) y Crespo et al., (2021b) demostraron que la inclusión de gramíneas como CC, junto una adecuada fertilización, lograron menores reducciones del Norg y COT respecto monocultivo de soja en 0-5 cm. Donde los aumentos del Norg se habrían asociado a la producción de biomasa de los CC, precipitaciones y textura del suelo, mientras que el balance de COT del suelo continuó siendo negativo, logrando reducir la tasa de pérdida del mismo. Duval et al., (2016) reportaron similares resultados en los estratos superficiales, destacando al cultivo de trigo como la mejor alternativa de CC para incluir como estrategia de intensificación en monocultivo de soja. Sin embargo, la magnitud de respuestas a los

cambios de C y N del suelo depende en gran medida de otros factores que afectan la producción de cultivos. Beltrán et al., (2021), concluyeron que las diferencias en las fracciones lábiles de COS (0-5 cm) en la región pampeana, fueron mayores en suelos de textura gruesa y menores en textura fina, y el N mostro similares respuestas al COS por la inclusión de CC, demostrando que la relación C/N no fue afectada.

En el ELD 2 se observó correlación entre II leguminosas (donde soja fue la única leguminosa de la rotación) y el aporte acumulado de N-FBN en restos vegetativos y raíces ($Y=3808x$, $r^2=0,93$), demostrando que este índice permite predecir los aportes de N-FBN en secuencias a base de soja.

Sin embargo, estos mayores aportes de N-FBN en estructuras vegetativas, solo produjeron aumentos del Ntotal en 0-7,5 cm luego de 9 años de intensificación en secuencias CC/Sj y Mz-CC/Sj-Trg/Sj.

Los aportes de COT y COP mostraron ser inferiores en 2018 y 2019 respecto 2016 (Tablas 4.12 y 4.13), aunque se observó mayores niveles de carbono en suelo con mayores II gramíneas (Figura 4.15 Anexo). Por lo tanto, se rechaza la quinta hipótesis, que proponía que, en secuencias a base de soja rotada con diferente proporción de gramíneas, los aportes de N-FBN de soja no cambiarían los contenidos de NOT y NOP en suelo pero si los del COT y COP por la mayor contribución de gramíneas. Esta hipótesis se rechaza debido a que no hubo cambios en el N del suelo por mayores aportes de N-FBN, y el COT y COP no difirieron entre rotaciones a pesar de los mayores aportes de C de gramíneas. Esto se debe posiblemente, a que las secuencias de cultivos estudiadas en el ELD2 requieren una mayor cantidad de N en el sistema para lograr que el C de la biomasa pueda ser mineralizado e incorporado a como C del suelo. El II de leguminosas en ELD2 vario de 0,20 a 0,39, siendo insuficiente el aporte de N en relación al aporte de C. En cambio, en el ELD1, el II de leguminosas exploro un mayor rango (0,19 a 0,61). Estos resultados coinciden con los resultados previos que indicaron que las rotaciones deberían poseer un balance similar entre proporción de gramíneas y leguminosas para lograr mayores aportes de C al suelo (Jian et al., 2020).

Las diferencias en proporción de gramíneas y leguminosas, el tipo de suelo y el clima, influyen significativamente en el almacenamiento de carbono en el suelo, y los aportes de las raíces son cruciales para determinar las prácticas de manejo adecuada para mejorar el stock de carbono (Frasier et al., 2019). Mazzilli et al., (2015) demostraron que la biomasa de raíces es 10 veces más importante en términos de aporte de carbono al suelo respecto la biomasa vegetativa aérea, sin embargo, en capítulos previos se determinó que una gran diferencia de aporte de biomas aérea vegetativa respecto la subsuperficial, ya que las raíces representarían en promedio menos del 10% de biomasa total en cultivos de grano en madurez fisiológica, y aproximadamente 19% en cultivos

de cobertura en floración/encañazon. Debido a esto, se analizó también la significancia de cada fracción de residuos vegetativo (aéreo o aéreo + subsuperficial) sobre el COT, demostrando que solo en las rotaciones con soja de segunda del ELD1 (Figura 4.13 b) y en las rotaciones evaluadas en 2018 del ELD2 (Figura 4.13 c), al sumar el C acumulado de biomasa de raíces junto al C acumulado de estructuras vegetativas aéreas, se logró mejorar la correlación de aportes de C con el COT 0-30 cm respecto que si solo se considerara el C de biomasa aérea.

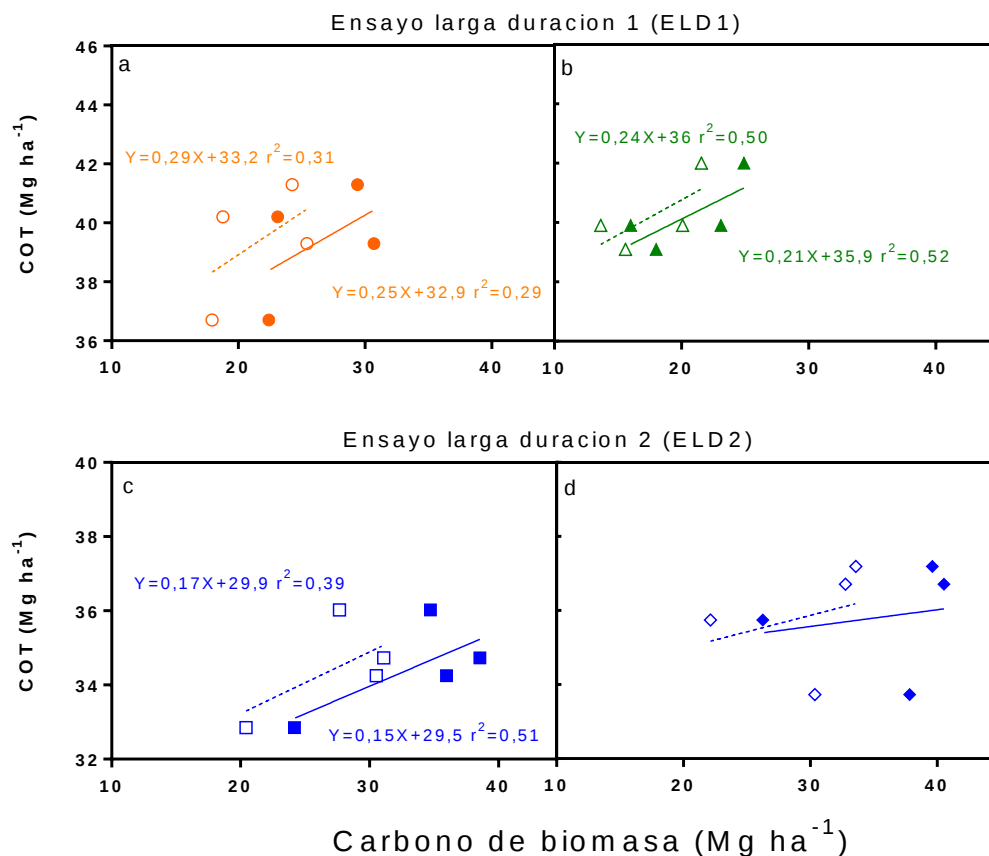


Figura 4.13. Relación del carbono orgánico total final del suelo hasta 30 cm de profundidad (COT) y carbono acumulado en residuos vegetativos aéreos (símbolos vacíos) y carbono acumulado en residuos vegetativos totales incluyendo raíces (símbolos llenos), para los dos ensayos de larga duración. a) rotaciones del ELD1 con maíz, b) rotaciones del ELD1 con soja de segunda, c) rotaciones del ELD2 evaluadas en 2018 y d) rotaciones del ELD2 evaluadas en 2019.

Por lo tanto, se rechaza la sexta hipótesis, que afirmaba que la inclusión de los aportes acumulados de C de biomasa de raíces al C de la biomasa aérea vegetativa lograría una mayor asociación a los cambios de COT del suelo. Esta hipótesis se rechaza, debido a que solo en un conjunto de datos se logró mejorar la asociación del

COT por inclusión del C de raíces, mientras que en la restante mitad de datos esto no ocurrió. El COP acumulado hasta 7,5 cm de profundidad, tampoco demostró mejores ajustes por inclusión de C de biomasa subsuperficial (Figura 4.16 anexo)

Sin embargo, cuando se incluyeron los aportes acumulados de N-FBN de las estructuras subsuperficiales, se logró mejorar significativamente el balance de N de sistema de cada rotación, tanto en ELD 1 como ELD2 (Figura 4.14), por lo cual se acepta la séptima hipótesis que enunciaba que la incorporación de los aportes acumulados de N-FBN de raíces mejoraría significativamente los balances de N. Estos aportes acumulados de N-FBN de raíces fueron 28-77 kg N ha⁻¹ en ELD1, y 31-85 kg N ha⁻¹ en ELD2. A pesar que el ELD1 se evaluó solo durante 6 años, se observa que, debido al mayor porcentaje de leguminosas, igualo los aportes de las rotaciones del ELD2 de 9 años, y demostró mayor potencial de incremento en los balances por mayores aportes de N-FBN subsuperficial y mayor relación y creciente entre BP_{BT} y BP_{BA} (Figura 4.15)

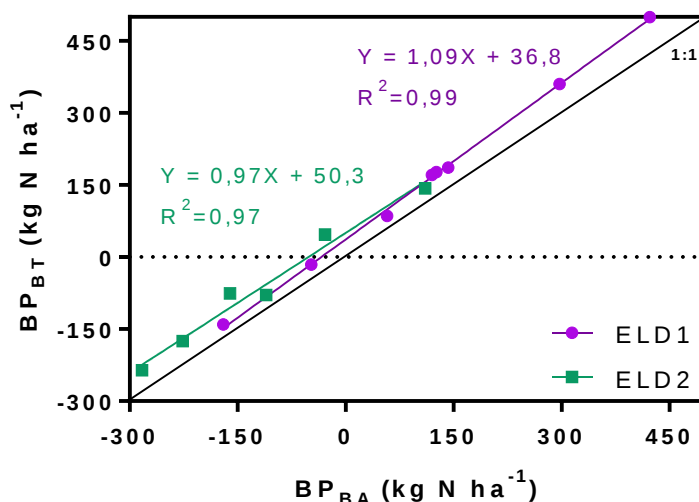


Figura 4.14. Relacion entre balance parcial acumulado de N de biomasa aérea (BP_{BA}) y balance parcial acumulado de N de biomasa total (BP_{BT}), para los ensayos de larga duración 1 y 2 (ELD1 y ELD2).

Estos resultados concuerdan con (Palmero et al., 2022) que concluyeron que la incorporación del N subsuperficial en la estimación del balance de N demostró ser un componente clave para estudiar el papel de las leguminosas en el mantenimiento de la fertilidad nitrogenada del suelo en sistemas agrícolas a largo plazo. En este trabajo, se observó que los mayores balances de N en rotaciones se explicaron por los mayores II leguminosas y que a su vez alcanzaron mayor acumulación de N del suelo hasta 7,5 cm de profundidad.

Herridge et al., (2008) menciona las dificultades de obtener un único valor para la estimación del N subsuperficial de cultivos, y que la variación en las estimaciones publicadas refleja los efectos de los diferentes cultivos, suelos y clima en la distribución del N dentro de la planta. Los resultados de este capítulo utilizan determinaciones subsuperficiales de N derivado de FBN de leguminosas que fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de suelo y clima, y con la utilización de las mismas especies de arveja y vicia, y similares cultivares de soja. A pesar de que no se incluyeron posibles aportes de N de exudados, estos deberían ser evaluados tanto en leguminosas como gramíneas, para lograr estimaciones más precisas de los balances de N.

4.5. CONCLUSIÓN

La intensificación de rotaciones por medio de incorporación de cultivos de leguminosa durante períodos de barbecho mejora los balances de N del sistema, sin embargo, la respuesta de estos balances está condicionada por los índices de intensificación de leguminosas en rotación, debido a que los aportes de N provenientes de FBN explican en mayor medida los resultados del balance de N. Estos mayores aportes de N-FBN de biomasa en rotaciones produce mayores aportes de C y N del suelo.

El cultivo de vicia como cultivo de cobertura realiza mayores aportes de N-FBN, siendo la mejor alternativa de intensificación de secuencias para aportar N y C. El cultivo de arveja para producción de granos no produce diferencias de balance de N respecto la inclusión de trigo o la no inclusión de cultivos invernales.

La inclusión de trigo como cultivo de cobertura mejora los aportes de C en rotaciones, pero no produce cambios en el N del suelo.

El C extra aportado por raíces mejora parcialmente la correlación del COT del suelo respecto el C vegetativo aéreo. Para precisar estas estimaciones y lograr mejores conclusiones sería necesario realizar determinaciones de los aportes de C de raíces de maíz en condiciones de campo, bajo las mismas condiciones de suelo, clima y productividad del cultivo.

El aporte adicional de N-FBN de raíces es un componente importante del balance de N, que a pesar de no modificar el signo del balance contribuye con 10 a 15% de los aportes totales de N-FBN de la biomasa vegetativa,

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSIONES

La pérdida de nutrientes y fertilidad de los suelos de la región pampeana Argentina es una problemática creciente de las últimas décadas, que atenta contra la productividad y sostenibilidad de los sistemas agrícola. La demanda global creciente de producción de alimentos, y la limitada superficie cultivable, requiere de sistemas que progresivamente sean más productivos y perdurables en el tiempo, y esto se lograría por mayores rendimientos manteniendo el nivel de insumos externos utilizados, o sosteniendo los rendimientos a costa de una menor dependencia de insumos.

Por lo tanto, el estudio de los balances de N de los cultivos más utilizados en la región pampeana y en distintas secuencias de rotación, brinda importante información para futuros planteos en sistemas productivos donde se busque mejorar los niveles de reposición de nutrientes. Una de las prácticas más difundidas para generar aportes de nutrientes es la implementación de cultivos de cobertura, especialmente leguminosas, o la intensificación de rotaciones por medio de inclusión de cultivos en períodos de barbechos, contribuyendo a mejorar los balances de carbono y nitrógeno del suelo. Además, es crucial considerar el aporte de las estructuras subsuperficiales para realizar estimaciones más precisas de los balances de nutrientes.

En este capítulo, se realiza una síntesis integradora de las principales conclusiones y observaciones de ésta tesis, en base a las evidencias halladas, a los objetivos inicialmente planteados y las conclusiones de cada hipótesis.

Las determinaciones de biomasa subsuperficial realizadas en esta tesis demostraron que los aportes de raíces y nódulos hasta 30 cm de profundidad son inferiores a los valores de referencia ampliamente difundidos, que son tomados en cuenta para las estimaciones respecto biomasa aérea o rendimiento en grano. La metodología para cuantificar las estructuras subsuperficiales utilizada en esta tesis aseguró una precisa recuperación física de raíces de los cultivos, capturando toda la variabilidad del espacio muestral, y reduciendo significativamente el coeficiente de variación de muestreos respecto referencias bibliográfica, siendo un factor de gran importancia en estos tipos de determinaciones.

Incluir los aportes de N de FBN en los balances de N de leguminosas fue determinante por la mejora en los resultados de estos balances, a pesar de los bajos aportes netos que estas estructuras representan.

Los balances de N del cultivo de soja fueron superiores a los promedios generales estimados en bibliografía, con resultados levemente negativos y positivos, dado por un alto % Ndfa durante las campañas evaluadas. A pesar de que de los aportes

de N-FBN de raíces y nódulos fueron bajos en términos absolutos, fueron suficientes para cambiar el signo del balance de negativo a positivo cuando los resultados fueron cercanos a la neutralidad. Este experimento demostró que un alto %Ndfa y condiciones sin estrés que permitan una elevada ganancia de N durante el período de llenado de grano propiciarían balances de N positivos en soja. Sin embargo, las estimaciones promedio de %Ndfa de la región pampeana se encuentran por debajo del nivel necesario para alcanzar balances neutros, y debido a esto los balances de soja seguirán siendo predominantemente negativos.

Estos resultados de balances y el amplio predominio del cultivo de soja durante las últimas décadas llevaron a una continua extracción de N de los sistemas productivos, que solo podrían ser compensados con inclusión de leguminosas como cultivos de cobertura. En ese sentido, el cultivo de vicia implantado como cultivo de cobertura demostró realizar importantes aportes de N al sistema, incluso en siembras tardías.

A pesar de que los resultados respecto el atraso de fecha de siembra deberían ser comprobados en un mayor rango de condiciones, esto conformaría una importante información para la toma de decisión de productores, debido a que la siembra de cultivos de servicios se ve muy condicionada por las condiciones de humedad de suelo, que suele ser escasa para las fechas de siembras tempranas que optimizarían la producción de biomasa. Sin embargo, mayores aportes de N-FBN ante el atraso de siembra podrían permitir implantar este cultivo con fechas que normalmente se consideran tardías para realizarlo. En estas condiciones el cultivo de cobertura no brindaría competencia con malezas y reduciría los aportes de C en floración, pero seguiría contribuyendo con aporte de N al sistema.

A comparación del cultivo de vicia que aportó grandes cantidades de N, el cultivo de arveja no aportó N a través de FBN, debido al escaso aporte de N-FBN en biomasa y a la extracción de N con los granos que presenta, resultando en balances negativos o cercanos a la neutralidad. Incluso evaluado en rotaciones, la intensificación con arveja no produciría cambios en el N respecto la no inclusión de cultivos invernales o la inclusión de trigo. Sin embargo, la inclusión del cultivo permitiría reducir pérdidas de nutrientes que podrían ser lixiviados durante los períodos de barbecho, y permite lograr mayor productividad en cultivos estivales respecto antecesor trigo, por siembra anticipadas y mejoras en los balances hídricos.

Los ensayos de larga duración evaluados en esta tesis son experimentos realizados bajo las recomendaciones de correcto manejo nutricional de cultivos, abasteciendo la demanda y necesidades nutricionales que optimizan la productividad de los cultivos. Por ello, se debe tener en cuenta que los niveles de fertilización de gramíneas en estos experimentos estuvieron por encima de las dosis promedio que

utilizan los productores, pudiendo ser los balances de N evaluados más positivos respecto lo que ocurre a nivel de productor, que utilizan mayormente dosis de N por debajo del óptimo.

Los resultados de ensayos de larga duración demostraron que una mayor intensificación con leguminosas permite lograr mejores aprovechamientos del C de biomasa por mineralización de residuos, aumentando el C del suelo, mientras que la intensificación solo con gramíneas como cultivo de cobertura demostró una baja contribución al COT del suelo y leves reducciones de los stocks de C en el tiempo. Por lo tanto, es esencial en la planificación de secuencias de rotaciones, intensificar con inclusión de cultivos en períodos de barbechos, manteniendo proporciones equilibradas de gramíneas y leguminosas para lograr mayores aumentos tanto de C como N en suelo. La mayor participación de leguminosas asegurará un mayor aporte de N-FBN, y mayores resultados en los balances parciales de N. Por otra parte, si bien es esperable que la ocupación del suelo con leguminosas en el invierno aporten N al sistema, esta tesis claramente mostro que para tener ganancias de N en el sistema es necesario la incorporación de cultivo de cobertura como la vicia, que no realizaron exportaciones de N del sistema, en contraposición a cultivos como la arveja que no mostraron efectos significativos en el balance de N en el mediano plazo.

Los aportes de N de estructuras subsuperficiales fueron significativos en todos los experimentos detallados, demostrando la importancia de la inclusión de las mismas, principalmente para estimaciones a largo plazo y escalas regionales.

5.2 FUTURAS LÍNEAS DE TRABAJO:

A partir de los resultados de este trabajo y del análisis de los datos de estas investigaciones surgen posibles líneas de investigación:

Inicialmente continuar con determinaciones en condiciones de campo de los aportes de biomasa subsuperficial de cultivos de gramíneas. Determinar los aportes del cultivo de trigo, maíz y sorgo en condiciones contrastantes de crecimiento (condición hídrica o nutricional). Los aportes de biomasa subsuperficial son de gran importancia para estimaciones de los balances de nutrientes y stocks de carbono. También realizar determinaciones de los aportes de biomasa subsuperficial de pasturas y evaluar la dinámica de los aportes subsuperficiales durante todo el ciclo del cultivo. En todos los cultivos determinar la concentración de nutrientes en estructuras subsuperficiales y aéreas, para construir los índices de cosecha de los macro y micro nutrientes, y ajustar niveles de extracción de cada uno.

En segundo lugar, estudiar la intensificación de rotaciones sobre los cambios en stocks de C, considerando la intensificación según el período de crecimiento activo de raíces, e incluyendo aportes de exudados radicales.

Estudiar en el largo plazo el rol del manejo del N utilizando cultivos de cobertura como vicia en la dinámica del C del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla M, Hastings A, Cheng K, Yue Q, Chadwick D, Espenberg M, Truu J, Rees RM, Smith P (2019) A critical review of the impacts of cover crops on nitrogen leaching, net greenhouse gas balance and crop productivity. *Global Change Biology* 25: 2530-2543. doi: <https://doi.org/10.1111/gcb.14644>.
- Abi-Ghanem R, Carpenter-Boggs L, Smith JL (2011) Cultivar effects on nitrogen fixation in peas and lentils. *Biology and Fertility of Soils* 47: 115-120.
- Alvarez R, Steinbach HS, De Paepe JL (2017) Cover crop effects on soils and subsequent crops in the pampas: A meta-analysis. *Soil and Tillage Research* 170: 53-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.03.005>.
- Amos B, Walters DT (2006) Maize Root Biomass and Net Rhizodeposited Carbon. 70.
- Andrade JF, Poggio SL, Ermácora M, Satorre EH (2015) Productivity and resource use in intensified cropping systems in the Rolling Pampa, Argentina. *European Journal of Agronomy* 67: 37-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.03.001>.
- Andrade JF, Satorre EH (2015) Single and double crop systems in the Argentine Pampas: Environmental determinants of annual grain yield. *Field Crops Research* 177: 137-147.
- Anglade J, Billen G, Garnier J (2015) Relationships for estimating N₂ fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere* 6: art37. doi: [doi: 10.1890/ES14-00353.1](https://doi.org/10.1890/ES14-00353.1).
- Arcand MM, Knight JD, Farrell RE (2013a) Temporal dynamics of nitrogen rhizodeposition in field pea as determined by ¹⁵N labeling. *Canadian Journal of Plant Science* 93: 941-950. doi: [doi: 10.4141/cjps2013-050](https://doi.org/10.4141/cjps2013-050).
- Arcand MM, Knight JD, Farrell RE (2013b) Estimating belowground nitrogen inputs of pea and canola and their contribution to soil inorganic N pools using ¹⁵N labeling. *Plant and Soil* 371: 67-80.
- Armstrong EL, Pate J, Unkovich MJ (1994a) Nitrogen Balance of Field Pea Crops in South Western Australia, Studied Using the ¹⁵N Natural Abundance Technique. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 533-549. doi: Refereed article in scholarly journal (C1).
- Armstrong EL, Pate JS, Tennant D (1994b) The Field Pea Crop in South Western Australia & Patterns of Water Use and Root Growth in Genotypes of Contrasting Morphology and Growth Habit. *Functional Plant Biology* 21: 517-532.
- Ashworth AJ, Owens PR, Allen FL (2020) Long-term cropping systems management influences soil strength and nutrient cycling. *Geoderma* 361: 114062.
- Austin AT, Piñeiro G, Gonzalez-Polo M (2006) More is less: agricultural impacts on the N cycle in Argentina. In: LA Martinelli, RW Howarth (eds) *Nitrogen Cycling in the Americas: Natural and Anthropogenic Influences and Controls*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Bacanamwo M, Purcell LC (1999) Soybean Root Morphological and Anatomical Traits Associated with Acclimation to Flooding. *Crop Science* 39: 143-149.
- Bacigaluppo S, Bodrero ML, Balzarini M, Gerster GR, Andriani JM, Enrico JM, Dardanelli JL (2011) Main edaphic and climatic variables explaining soybean yield in Argiudolls under no-tilled systems. *European Journal of Agronomy* 35: 247-254. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2011.07.001>.
- Bationo A, Kihara J, Vanlauwe B, Waswa B, Kimetu J (2007) Soil organic carbon dynamics, functions and management in West African agro-ecosystems. *Agricultural Systems* 94: 13-25.
- Battisti R, Ferreira MDP, Tavares ÉB, Knapp FM, Bender FD, Casaroli D, Alves Júnior J (2020) Rules for grown soybean-maize cropping system in Midwestern Brazil: Food production and

- economic profits. *Agricultural Systems* 182: 102850. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.102850>.
- Beck DP, Wery J, Saxena MC, Ayadi A (1991) Dinitrogen Fixation and Nitrogen Balance in Cool-Season Food Legumes. *Agronomy Journal* 83: 334-341. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300020015x>.
- Beltrán M, Galantini JA, Salvagiotti F, Tognetti P, Bacigaluppo S, Sainz Rozas HR, Barraco M, Barbieri PA (2021) Do soil carbon sequestration and soil fertility increase by including a gramineous cover crop in continuous soybean? *Soil Science Society of America Journal* 85: 1380-1394. doi: <https://doi.org/10.1002/saj2.20257>.
- Bender RR, Haegerle JW, Below FE (2015) Nutrient Uptake, Partitioning, and Remobilization in Modern Soybean Varieties. *Agronomy Journal* 107: 563-573. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj14.0435>.
- Benjamin JG, Nielsen DC (2006) Water deficit effects on root distribution of soybean, field pea and chickpea. *Field Crops Research* 97: 248-253.
- Bergersen FJ, Turner GL, Peoples MB, Gault RR, Morthorpe LJ, Brockwell J (1992) Nitrogen fixation during vegetative and reproductive growth of irrigated soybeans in the field: application of d 15N methods. *Australian Journal of Agricultural Research* 43: 145-153.
- Biassoni MM, Vivas H, Gutiérrez-Boem FH, Salvagiotti F (2023) Changes in soil phosphorus (P) fractions and P bioavailability after 10 years of continuous P fertilization. *Soil and Tillage Research* 232: 105777. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105777>.
- Bolinder MA, Janzen HH, Gregorich EG, Angers DA, VandenBygaart AJ (2007) An approach for estimating net primary productivity and annual carbon inputs to soil for common agricultural crops in Canada. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 118: 29-42.
- Boyer EW, Howarth RW, Galloway JN, Dentener FJ, Cleveland C, Asner GP, Green P, Vörösmarty C (2004) Current nitrogen inputs to world regions. *Agriculture and the nitrogen cycle: assessing the impacts of fertilizer use on food production and the environment* 65: 221.
- Brady NC, Weil RR, Weil RR (2008) *The nature and properties of soils*. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil science*, 59(1), 39-46. <https://doi.org/10.1097/00010694194501000-00006>
- Bremner JM (1965) Inorganic Forms of Nitrogen. *Methods of Soil Analysis*.
- Cafaro La Menza F, Carciochi WD (2023) Catch crops in the Argentinean Pampas: a synthesis analysis on nutrient characteristics and their implications for a sustainable agriculture. *Frontiers in Agronomy* 5. doi: 10.3389/fagro.2023.1244057.
- Cafaro La Menza N, Monzon JP, Specht JE, Grassini P (2017) Is soybean yield limited by nitrogen supply? *Field Crops Research* 213: 204-212.
- Cambardella CA, Elliott ET (1992) Particulate Soil Organic-Matter Changes across a Grassland Cultivation Sequence. *Soil Science Society of America Journal* 56: 777-783. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600030017x>.
- Carciochi WD, Cafaro La Menza F, Crespo C, Dominguez G, Rodriguez MP, Reussi Calvo NI, Wyngaard N, Sainz Rozas HR, Studdert G, Barbieri P (2023) Analysis of factors controlling maize yield response to hairy vetch and to nitrogen fertilization after hairy vetch. *Field Crops Research* 303: 109138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2023.109138>.
- Carranca C, Torres MO, Madeira M (2015) Underestimated role of legume roots for soil N fertility. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 1095-1102.
- Carter MR, Gregorich EG (2007) *Soil sampling and methods of analysis*. CRC press.
- Cassman KG, Whitney AS, Stockinger KR (1980) Root Growth and Dry Matter Distribution of Soybean as Affected by Phosphorus Stress, Nodulation, and Nitrogen Source¹. *Crop Science* 20: 239-244.

- Caviglia OP, Andrade FH (2010) Sustainable intensification of agriculture in the Argentinean Pampas: capture and use efficiency of environmental resources. *Am J Plant Sci Biotechnol* 3: 1-8.
- Cheng W, Johnson DW, Fu S (2003) Rhizosphere Effects on Decomposition. *Soil Science Society of America Journal* 67: 1418-1427. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.1418>.
- Christophe S, Jean-Christophe A, Annabelle L, Alain O, Marion P, Anne-Sophie V (2011) Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat and water stresses: a review based on comparison of legumes and non legume plants. *Abiotic stress in plants—mechanisms and adaptations*: 79-118.
- Christopher SF, Lal R (2007) Nitrogen Management Affects Carbon Sequestration in North American Cropland Soils. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26: 45-64. doi: [10.1080/07352680601174830](https://doi.org/10.1080/07352680601174830).
- Ciampitti IA, García FO, Picone LI, Rubio G (2011) Soil Carbon and Phosphorus Pools in Field Crop Rotations in Pampean Soils of Argentina. *Soil Science Society of America Journal* 75: 616-625. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0168>.
- Ciampitti IA, Salvagiotti F (2018) New Insights into Soybean Biological Nitrogen Fixation. 110: 1185-1196.
- Collino DJ, Salvagiotti F, Peticari A, Piccinetti C, Ovando G, Urquiaga S, Racca RW (2015) Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors. *Plant and Soil* 392: 239-252.
- Conceição PC, Dieckow J, Bayer C (2013) Combined role of no-tillage and cropping systems in soil carbon stocks and stabilization. *Soil and Tillage Research* 129: 40-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2013.01.006>.
- Correndo A, Flavio H. Gutiérrez-Boem, Fernando O. García, Carolina Alvarez, Cristian Álvarez, Ariel Angeli, Pablo Barbieri, Mirian Barraco, Angel Berardo, Miguel Boxler, Pablo Calviño, Julia E. Capurro, Héctor Carta, Octavio Caviglia, Ignacio A. Ciampitti, Martín Díaz-Zorita, Santiago Díaz-Valdéz, Hernán E. Echeverría, Gabriel Espósito, Manuel Ferrari, Gustavo N. Ferraris, Sebastian Gambaudo, Vicente Gudelj, Juan P. Ioele, Ricardo J.M. Melchiori, Josefina Molino, Juan M. Orcellet, Agustin Pagani, Juan M. Pautasso, Nahuel I. Reussi Calvo, Matías Redel, Sergio Rillo, Helena Rimski-Korsakov, Hernán R. Sainz-Rozas, Matías Saks, Ma. Guadalupe Tellería, Luis Ventimiglia, Jose L. Zorzín, Ma. Mercedes Zubillaga, Fernando Salvagiotti, (2021) Attainable yield and soil texture as drivers of maize response to nitrogen: A synthesis analysis for Argentina. *Field Crops Research* 273: 108299.
- Correndo AA, Adeo E, Rosso LHM, Tremblay N, Prasad PVV, Du J, Ciampitti IA (2022) Footprints of corn nitrogen management on the following soybean crop. *Agronomy Journal* 114: 1475-1488. doi: <https://doi.org/10.1002/agj2.21023>.
- Crespo C, Wyngaard N, Sainz Rozas H, Barbagelata P, Barraco M, Gudelj V, Barbieri P (2021a) Improving soil organic nitrogen and sulfur pools by cover cropping and crop fertilization in soybean-based cropping systems. *Soil and Tillage Research* 213: 105138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105138>.
- Crespo C, Wyngaard N, Sainz Rozas H, Studdert G, Barraco M, Gudelj V, Barbagelata P, Barbieri P (2021b) Effect of the intensification of cropping sequences on soil organic carbon and its stratification ratio in contrasting environments. *CATENA* 200: 105145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105145>.
- Crews TE, Peoples MB (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 102: 279-297. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>.
- Danga BO, Ouma JP, Wakindiki IIC, Bar-Tal A (2009) Chapter 5 Legume-Wheat Rotation Effects on Residual Soil Moisture, Nitrogen and Wheat Yield in Tropical Regions. In: DL Sparks (ed) *Advances in Agronomy*. 101 edn. Academic Press.

- Dardanelli JL, Bachmeier OA, Sereno R, Gil R (1997) Rooting depth and soil water extraction patterns of different crops in a silty loam Haplustoll. *Field Crops Research* 54: 29-38.
- Dart PJ, Day JM (1971) Effects of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. *Plant and Soil* 35: 167-184.
- De Vries FP (1972) *Respiration and growth. Crop processes in controlled environments.* Academic Press.
- Díaz de Astarloa DA, Pengue WA (2018) Nutrients Metabolism of Agricultural Production in Argentina: NPK Input and Output Flows from 1961 to 2015. *Ecological Economics* 147: 74-83.
- Dingkuhn M, Le Gal P-Y (1996) Effect of drainage date on yield and dry matter partitioning in irrigated rice. *Field Crops Research* 46: 117-126. doi: [https://doi.org/10.1016/03784290\(95\)00094-1](https://doi.org/10.1016/03784290(95)00094-1).
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011) *InfoStat.* versión 24-03-2011 edn. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina
- Dixon R, Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2: 621-631. doi: 10.1038/nrmicro954.
- Duval ME, Galantini JA, Capurro JE, Martinez JM (2016) Winter cover crops in soybean monoculture: Effects on soil organic carbon and its fractions. *Soil and Tillage Research* 161: 95-105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.04.006>.
- Enrico JMn, Piccinetti CF, Barraco MR, Agosti MBn, Ecclesia RP, Salvagiotti F (2020) Biological nitrogen fixation in field pea and vetch: Response to inoculation and residual effect on maize in the Pampean region. *European Journal of Agronomy* 115: 126016.
- Erismann JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* 1: 636-639.
- Evans J, McNeill AM, Unkovich MJ, Fettel NA, Heenan DP (2001) Net nitrogen balances for coolseason grain legume crops and contributions to wheat nitrogen uptake: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41: 347-359.
- Fabrizzi KP, Morón A, García FO (2003) Soil Carbon and Nitrogen Organic Fractions in Degraded vs. Non-Degraded Mollisols in Argentina. *Soil Science Society of America Journal* 67: 1831-1841. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.1831>.
- Fageria NK (2014) *Nitrogen management in crop production.* CRC press.
- Fageria NK, Baligar VC, Bailey BA (2005) Role of Cover Crops in Improving Soil and Row Crop Productivity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36: 2733-2757. doi: [doi: 10.1080/00103620500303939](https://doi.org/10.1080/00103620500303939).
- Fan J, McConkey B, Wang H, Janzen H (2016) Root distribution by depth for temperate agricultural crops. *Field Crops Research* 189: 68-74.
- Fontana, M. B., Novelli, L. E., Sterren, M. A., Urich, W. G., Benintende, S. M., & Barbagelata, P. A. (2021). Long-term fertilizer application and cover crops improve soil quality and soybean yield in the Northeastern Pampas region of Argentina. *Geoderma*, 385, 114902.
- Frasier I, Quiroga A, Fernández R, Álvarez C, Gómez F, Scherger E, Gili A, Noellemeyer E (2019) Soil type, land-use and -management as drivers of root-C inputs and soil C storage in the semiarid pampa region, Argentina. *Soil and Tillage Research* 192: 134-143. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.05.010>.
- Fustec JL, Lesuffleur F, Mahieu Sp, Cliquet JB (2010) Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 57-66.
- Gabriel JL, Alonso-Ayuso M, García-González I, Hontoria C, Quemada M (2016) Nitrogen use efficiency and fertiliser fate in a long-term experiment with winter cover crops. *European Journal of Agronomy* 79: 14-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.04.015>.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green P, Holland EA (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70: 153-226.

- Galloway JN, Townsend AR, Erismann JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA (2008) Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320: 889.
- Gan Y, Campbell CA, Janzen HH, Lemke RL, Basnyat P, McDonald CL (2010) Nitrogen accumulation in plant tissues and roots and N mineralization under oilseeds, pulses, and spring wheat. *Plant and Soil* 332: 451-461.
- Gan YT, Campbell CA, Janzen HH, Lemke R, Liu LP, Basnyat P, McDonald CL (2009) Root mass for oilseed and pulse crops: Growth and distribution in the soil profile. *Canadian Journal of Plant Science* 89: 883-893. doi: doi: 10.4141/CJPS08154.
- Gaspar AP, Laboski CAM, Naeve SL, Conley SP (2017) Dry Matter and Nitrogen Uptake, Partitioning, and Removal across a Wide Range of Soybean Seed Yield Levels. *Crop Science* 57: 2170-2182. doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.05.0322>.
- Gelfand I, Philip Robertson G (2014) A reassessment of the contribution of soybean biological nitrogen fixation to reactive N in the environment. *Biogeochemistry* 123: 175-184.
- Giller KE, Cadisch G (1995) Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. In: JK Ladha, MB Peoples (eds) *Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems: Extended versions of papers presented at the Symposium on Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture at the 15th Congress of Soil Science, Acapulco, Mexico, 1994*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Gomez, K. A., & Gomez, A. A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research*. John Wiley & sons.
- Gregorutti, V. C., Novelli, L. E., Melchiori, R. J. M., Ormaechea, M. V., & Caviglia, O. P. (2014). Nitrógeno incubado en anaerobiosis y su relación con el nitrógeno orgánico en diferentes fracciones. *Ciencia del suelo*, 32(1), 41-51.
- Gruber N, Galloway JN (2008) An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451: 293.
- Grubinger V, Zobel R, Vendeland J, Cortes P (1982) Nodule Distribution on Roots of Field-Grown Soybeans in Subsurface Soil Horizons. *Crop Science* 22: crops201982.0011183X002200010036x. doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1982.0011183X002200010036x>.
- Hayden ZD, Ngouajio M, Brainard DC (2014) – Rye-Vetch Mixture Proportion Tradeoffs: Cover Crop Productivity, Nitrogen Accumulation, and Weed Suppression. *Agronomy Journal* 106: 904-914. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2013.0467>.
- Herridge DF, Bergersen FJ, Peoples MB (1990) Measurement of Nitrogen Fixation by Soybean in the Field Using the Ureide and Natural ¹⁵N Abundance Methods 1. *Plant Physiology* 93: 708-716.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311: 1-18.
- Hoogenboom G, Huck MG, Peterson CM (1987) Root Growth Rate of Soybean as Affected by Drought Stress1. *Agronomy Journal* 79: 607-614. doi: doi: 10.2134/agronj1987.00021962007900040004x.
- Iannetta PPM, Young M, Bachinger J, Bergkvist G, Doltra J, Lopez-Bellido RJ, Monti M, Pappa VA, Reckling M, Topp CFE, Walker RL, Rees RM, Watson CA, James EK, Squire GR, Begg GS (2016) A Comparative Nitrogen Balance and Productivity Analysis of Legume and Nonlegume Supported Cropping Systems: The Potential Role of Biological Nitrogen Fixation. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01700.
- Jackson RB, Lajtha K, Crow SE, Hugelius G, Kramer MG, Prieiro G (2017) The Ecology of Soil Carbon: Pools, Vulnerabilities, and Biotic and Abiotic Controls. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48: 419-445. doi: doi: 10.1146/annurev-ecolsys112414-054234.

- Jian J, Du X, Reiter MS, Stewart RD (2020) A meta-analysis of global cropland soil carbon changes due to cover cropping. *Soil Biology and Biochemistry* 143: 107735. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107735>.
- Katterer T, Bolinder MA, Andrón O, Kirchmann H, Menichetti L (2011) Roots contribute more to refractory soil organic matter than above-ground crop residues, as revealed by a longterm field experiment. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 141: 184-192.
- Kehoe E, Rubio G, Salvagiotti F (2022) Contribution of different sources and origins of nitrogen in above- and below-ground structures to the partial nitrogen balance in soybean. *Plant and Soil* 477: 405-422. doi: 10.1007/s11104-022-05418-0.
- Kirda C, Danso SKA, Zapata F (1989) Temporal water stress effects on nodulation, nitrogen accumulation and growth of soybean. *Plant and Soil* 120: 49-55.
- Koritschoner JJ, Whitworth Hulse JI, Cuchietti A, Arrieta EM (2023) Spatial patterns of nutrients balance of major crops in Argentina. *Science of The Total Environment* 858: 159863. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159863>.
- Kumar K, Goh KM (1999) Crop Residues and Management Practices: Effects on Soil Quality, Soil Nitrogen Dynamics, Crop Yield, and Nitrogen Recovery. In: DL Sparks (ed) *Advances in Agronomy*. 68 edn. Academic Press.
- Kumar PA, Parry MAJ, Mitchell RAC, Ahmad A, Abrol YP (2002) Photosynthesis and Nitrogen-Use Efficiency. In: CH Foyer, G Noctor (eds) *Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Kumudini S, Hume DJ, Chu G (2002) REMOVILIZACION N SOJA - Genetic Improvement in ShortSeason Soybeans: II. Nitrogen Accumulation, Remobilization, and Partitioning. *Crop Science* 42: 141-145. doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1410>.
- Laberge G, Franke AC, Ambus P, Høgh-Jensen H (2009) Nitrogen rhizodeposition from soybean (*Glycine max*) and its impact on nutrient budgets in two contrasting environments of the Guinean savannah zone of Nigeria. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 84: 49-58.
- Ladha JK, Jat ML, Stirling CM, Chakraborty D, Pradhan P, Krupnik TJ, Sapkota TB, Pathak H, Rana DS, Tesfaye K, Gerard B (2020) Chapter Two - Achieving the sustainable development goals in agriculture: The crucial role of nitrogen in cereal-based systems. In: DL Sparks (ed) *Advances in Agronomy*. 163 edn. Academic Press.
- Liebig MA, Tanaka DL, Wienhold BJ (2004) Tillage and cropping effects on soil quality indicators in the northern Great Plains. *Soil and Tillage Research* 78: 131-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.02.002>.
- Liu W, Yang H, Liu J, Azevedo LB, Wang X, Xu Z, Abbaspour KC, Schulin R (2016) Global assessment of nitrogen losses and trade-offs with yields from major crop cultivations. *Science of The Total Environment* 572: 526-537. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.093>.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Nguyen VT, Shannon JG, Nguyen HT (2010) Evaluation of diverse soybean germplasm for root growth and architecture. *Plant and Soil* 330: 503-514.
- Martínez JP, Crespo C, Cuervo M, Echeverría H, Martínez F, Cordone G, Barbieri P (2022) Sustainable intensification of agriculture improves soil nitrogen in the Argentinean Humid Pampas. *Agronomy Journal* 114: 2200-2212. doi: <https://doi.org/10.1002/agj2.21063>.
- Mary B, Recous S, Darwis D, Robin D (1996) Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. *Plant and Soil* 181: 71-82. doi: 10.1007/BF00011294.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* 10: 23-36. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00097.x>.
- Mayaki WC, Stone LR, Teare ID (1976) Irrigated and Nonirrigated Soybean, Corn, and Grain Sorghum Root Systems1. *Agronomy Journal* 68: 532-534.

- Mazzilli SÍR, Kemanian AR, Ernst OR, Jackson RB, Piñeiro G (2015) Greater humification of belowground than aboveground biomass carbon into particulate soil organic matter in no-till corn and soybean crops. *Soil Biology and Biochemistry* 85: 22-30.
- McCallister DL, Shapiro CA, Raun WR, Anderson FN, Rehm GW, Engelstad OP, Russelle MP, Olson RA (1987) Rate of Phosphorus and Potassium Buildup/Decline with Fertilization for Corn and Wheat on Nebraska Mollisols. *Soil Science Society of America Journal* 51: 1646-1652. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj1987.03615995005100060043x>.
- McNeill AM, Zhu C, Fillery IRP (1997) Use of in situ ¹⁵N-labelling to estimate the total belowground nitrogen of pasture legumes in intact soil-plant systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 295-304.
- Melchiori, R. J., Novelli, L. E., Gregorutti, V. C., & Caviglia, O. P. (2014). Stover quality and soil organic carbon in long-term nitrogen-fertilized maize. *Agronomy Journal*, 106(5), 1709-1716.
- Mosconi F, Priano L, Hein N, Moscatelli G, Salazar J, Gutiérrez T, Cáceres L (1985) INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Carta de suelos de la República Argentina. Hoja 3360-7 y 8 -Totoras y Serodino
- Muchow RC, Robertson MJ, Pengelly BC (1993) Accumulation and partitioning of biomass and nitrogen by soybean, mungbean and cowpea under contrasting environmental conditions. *Field Crops Research* 33: 13-36.
- Nemecek T, von Richthofen JS, Dubois Gt, Casta P, Charles RI, Pahl H (2008) Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* 28: 380-393.
- Nissen T, Rodriguez V, Wander M (2008) Sampling Soybean Roots: A Comparison of Excavation and Coring Methods. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 1875-1883. doi: [doi: 10.1080/00103620802073933](https://doi.org/10.1080/00103620802073933).
- Novelli LE, Caviglia OP, Jobbágy EG, Sadras VO (2023) Diversified crop sequences to reduce soil nitrogen mining in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 341: 108208. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108208>.
- Novelli LE, Caviglia OP, Melchiori RJM (2011) Impact of soybean cropping frequency on soil carbon storage in Mollisols and Vertisols. *Geoderma* 167-168: 254-260.
- Novelli LE, Caviglia OP, Piñeiro G (2017) Increased cropping intensity improves crop residue inputs to the soil and aggregate-associated soil organic carbon stocks. *Soil and Tillage Research* 165: 128-136.
- O'Connor GE, Evans J, Fettel NA, Bamforth I, Stuchberry J, Heenan DP, Chalk PM (1993) Sowing date and varietal effects on the N₂ fixation of field pea and implications for improvement of soil nitrogen. *Australian Journal of Agricultural Research* 44: 151-163.
- Okito A, Alves BRJ, Urquiaga S, Boddey RM (2004) Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1179-1190.
- Ordóñez RA, Castellano MJ, Hatfield JL, Helmers MJ, Licht MA, Liebman M, Dietzel R, MartinezFeria R, Iqbal J, Puntel LA, Córdova SC, Togliatti K, Wright EE, Archontoulis SV (2018) Maize and soybean root front velocity and maximum depth in Iowa, USA. *Field Crops Research* 215: 122-131. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.09.003>.
- Ortez OA, Salvagiotti F, Enrico JM, Prasad PVV, Armstrong P, Ciampitti IA (2018) Exploring Nitrogen Limitation for Historical and Modern Soybean Genotypes. *Agronomy Journal* 110: 2080-2090. doi: [doi: 10.2134/agronj2018.04.0271](https://doi.org/10.2134/agronj2018.04.0271).
- Ortez OA, Tamagno S, Salvagiotti F, Prasad PVV, Ciampitti IA (2019) Soybean Nitrogen Sources and Demand During the Seed-Filling Period. *Agronomy Journal* 111: 1779-1787. doi: [doi: 10.2134/agronj2018.10.0656](https://doi.org/10.2134/agronj2018.10.0656).
- Palmero F, Fernandez JA, Garcia FO, Haro RJ, Prasad PVV, Salvagiotti F, Ciampitti IA (2022) A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural

- systems by grain legumes. *European Journal of Agronomy* 136: 126514. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126514>.
- Parr M, Grossman JM, Reberg-Horton SC, Brinton C, Crozier C (2011) VICIA N y FBN - Nitrogen Delivery from Legume Cover Crops in No-Till Organic Corn Production. *Agronomy Journal* 103: 1578-1590. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0007>.
- Peoples MB, Giller KE, Jensen ES, Herridge DF (2021) Quantifying country-to-global scale nitrogen fixation for grain legumes: I. Reliance on nitrogen fixation of soybean, groundnut and pulses. *Plant and Soil*.
- Piccinetti CF, Bacigaluppo S, Di Ciocco CA, De Tellería JM, Salvagiotti F (2021) Soybean in rotation with cereals attenuates nitrous oxide emissions as compared with soybean monoculture in the Pampas region. *Geoderma* 402: 115192.
- Picone LI, Bayer C, Videla CC, Rizzalli RH, Casanave Ponti SM, Andrade FH, García FO (2021) Nitrous oxide emissions in maize on mollisols in the Pampas of Argentina. *Geoderma Regional* 24: e00362. doi: <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2021.e00362>.
- Ping X, Zhou G, Zhuang Q, Wang Y, Zuo W, Shi G, Lin X, Wang Y (2010) Effects of sample size and position from monolith and core methods on the estimation of total root biomass in a temperate grassland ecosystem in Inner Mongolia. *Geoderma* 155: 262-268.
- Pinto P, Fernández Long MaE, Piñeiro G (2017) Including cover crops during fallow periods for increasing ecosystem services: Is it possible in croplands of Southern South America? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 248: 48-57.
- Pinto P, Rubio G, Gutierrez F, Sawchik J, Arana S, Piñeiro G (2021) Variable root:shoot ratios and plant nitrogen concentrations discourage using just aboveground biomass to select legume service crops. *Plant and Soil*.
- Piva JT, Bratti F, Locatelli JL, Ribeiro RH, Besen MR, Brancaloni E, Schmitt DE (2021) Use of winter cover crops improves maize productivity under reduced nitrogen fertilization: a long-term study. *Bragantia* 80: e0621.
- Poffenbarger HJ, Mirsky SB, Weil RR, Maul JE, Kramer M, Spargo JT, Cavigelli MA (2015) VICIA N Y FBN - Biomass and Nitrogen Content of Hairy Vetch-Cereal Rye Cover Crop Mixtures as Influenced by Species Proportions. *Agronomy Journal* 107: 2069-2082. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj14.0462>.
- Purcell LC, King CA (1996) Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. *Journal of Plant Nutrition* 19: 969-993. doi: [doi: 10.1080/01904169609365173](https://doi.org/10.1080/01904169609365173).
- Purcell LC, Serraj R, de Silva M, Sinclair TR, Bona S (1998) Ureide concentration of field grown soybean in response to drought and the relationship to nitrogen fixation. *Journal of Plant Nutrition* 21: 949-966. doi: [doi: 10.1080/01904169809365456](https://doi.org/10.1080/01904169809365456).
- Purcell LC, Serraj R, Sinclair TR, De A (2004) Soybean N₂ Fixation Estimates, Ureide Concentration, and Yield Responses to Drought. *Crop Science* 44: 484-492. doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.4840>.
- Renzi J, Cantamutto M (2013) *Vicias: Bases agronómicas para el manejo en la Región Pampeana*. Ediciones INTA Buenos Aires, Argentina.
- Renzi JP, Chantre GR, Smýkal P, Presotto AD, Zubiaga L, Garayalde AF, Cantamutto MA (2020) Diversity of Naturalized Hairy Vetch (*Vicia villosa* Roth) Populations in Central Argentina as a Source of Potential Adaptive Traits for Breeding. *Frontiers in Plant Science* 11. doi: [10.3389/fpls.2020.00189](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00189).
- Restovich SB, Andriulo AíE, Portela SI (2012) Introduction of cover crops in a maize-soybean rotation of the Humid Pampas: Effect on nitrogen and water dynamics. *Field Crops Research* 128: 62-70.

- Reussi Calvo NI, Sainz Rozas H, Echeverría H, Berardo A (2013) Contribution of Anaerobically Incubated Nitrogen to the Diagnosis of Nitrogen Status in Spring Wheat. *Agronomy Journal* 105: 321-328. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0287>.
- Reussi Calvo NI, Studdert GA, Calandroni MB, Diovisalvi NV, Cabria FN, Berardo A (2014) Nitrógeno incubado en anaerobiosis y carbono orgánico en suelos agrícolas de Buenos Aires. *Ciencia del suelo* 32: 189-196.
- Rimski-Korsakov H, Rubio G, Lavado RS (2004) Potential nitrate losses under different agricultural practices in the pampas region, Argentina. *Agricultural Water Management* 65: 83-94. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2003.08.003>.
- Ritchie, S. W. (2005). How a corn plant develops (No. 48). Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service.
- Rochester I, Peoples M (2005) VICIA N y FBN - Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: inputs of fixed N, N fertiliser savings and cotton productivity. *Plant and Soil* 271: 251-264.
- Rochester IJ, Peoples MB, Constable GA, Gault RR (1998) Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38: 253-260.
- Roder W, Mason SC, Clegg MD, Kniep KR (1989) Crop Root Distribution as Influenced by Grain Sorghum-Soybean Rotation and Fertilization. *Soil Science Society of America Journal* 53: 1464-1470. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj1989.03615995005300050027x>.
- Rubio G, Lavado RS, Pereyra FX (2019) *The soils of Argentina*. Springer.
- Rymuza K, Radzka Eb, Wysoki+ąski A (2020) Nitrogen Uptake from Different Sources by NonGMO Soybean Varieties. 10.
- Sadras V, Calderini D (2020) *Crop Physiology Case Histories for Major Crops*. Academic Press.
- Salvagiotti F, Cassman KG, Specht JE, Walters DT, Weiss A, Dobermann A (2008) Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research* 108: 113.
- Salvagiotti F, Krüger HR, Studdert G (2017) *Ensayos de larga duración en Argentina: un aporte al logro de sistemas agrícolas sustentables*. Ediciones INTA.
- Salvagiotti F, Magnano L, Ortez O, Enrico J, Barraco M, Barbagelata P, Condori A, Di Mauro G, Manlla A, Rotundo J, Garcia FO, Ferrari M, Gudelj V, Ciampitti I (2021) Estimating nitrogen, phosphorus, potassium, and sulfur uptake and requirement in soybean. *European Journal of Agronomy* 127: 126289. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126289>.
- Salvagiotti F, Specht JE, Cassman KG, Walters DT, Weiss A, Dobermann A (2009) Growth and Nitrogen Fixation in High-Yielding Soybean: Impact of Nitrogen Fertilization All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. *Agronomy Journal* 101.
- Santachiara G, Borrás L, Salvagiotti F, Gerde JA, Rotundo JL (2017) Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. *Plant and Soil* 418: 191-203.
- Serraj R, Sinclair TR, Purcell LC (1999) Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany* 50: 143-155.
- Setiyono TD, Walters DT, Cassman KG, Witt C, Dobermann A (2010) Estimating maize nutrient uptake requirements. *Field Crops Research* 118: 158-168.
- Shearer G, Kohl DH (1986) N₂-Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ¹⁵N Abundance. *Functional Plant Biology* 13: 699-756.
- Shearer G, Kohl DH, Harper JE (1980) Distribution of ¹⁵N Among Plant Parts of Nodulating and Nonnodulating Isolines of Soybeans 1. *Plant Physiology* 66: 57-60. doi:

10.1104/pp.66.1.57.

- Sinclair T, de Wit Ct (1975) Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. *Science* 189: 565-567.
- Smil V (1999) Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 647-662.
- Sucunza FA, Gutierrez Boem FH, Garcia FO, Boxler M, Rubio G (2018) Long-term phosphorus fertilization of wheat, soybean and maize on Mollisols: Soil test trends, critical levels and balances. *European Journal of Agronomy* 96: 87-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.03.004>.
- Suematsu K, Abiko T, Nguyen VL, Mochizuki T (2017) Phenotypic variation in root development of 162 soybean accessions under hypoxia condition at the seedling stage. *Plant Production Science*: 1-40. doi: doi: 10.1080/1343943X.2017.1334511.
- Tamagno S, Balboa GR, Assefa Y, Kovács P, Casteel SN, Salvagiotti F, García FO, Stewart WM, Ciampitti IA (2017) Nutrient partitioning and stoichiometry in soybean: A synthesis analysis. *Field Crops Research* 200: 18-27.
- 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.
- Unkovich, M. J., & Pate, J. S. (2000). An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, 65(2-3), 211-228.
- Varela MF, Scianca CM, Taboada MA, Rubio G (2014) Cover crop effects on soybean residue decomposition and P release in no-tillage systems of Argentina. *Soil and Tillage Research* 143: 59-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.still.2014.05.005>.
- Verma SB, Dobermann A, Cassman KG, Walters DT, Knops JM, Arkebauer TJ, Suyker AE, Burba GG, Amos B, Yang H, Ginting D, Hubbard KG, Gitelson AA, Walter-Shea EA (2005) Annual carbon dioxide exchange in irrigated and rainfed maize-based agroecosystems. *Agricultural and Forest Meteorology* 131: 77-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2005.05.003>.
- Viglizzo Ef, Frank Fc, Carreño Lv, Jobbagy Eg, Pereyra Hern, Clatt Jona, Pincén Dani, Ricard Mf (2011) Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Global Change Biology* 17: 959-973. doi: <https://doi.org/10.1111/j.13652486.2010.02293.x>.
- Vitousek PM, Menge DNL, Reed SC, Cleveland CC (2013) Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 368. doi: 10.1098/rstb.2013.0119.
- Vitousek PM, Naylor R, Crews T, David MB, Drinkwater LE, Holland E, Johnes PJ, Katzenberger J, Martinelli LA, Matson PA, Nziguheba G, Ojima D, Palm CA, Robertson GP, Sanchez PA, Townsend AR, Zhang FS (2009) Nutrient Imbalances in Agricultural Development. *Science* 324: 1519.
- Walley FL, Clayton GW, Miller PR, Carr PM, Lafond GP (2007) Nitrogen Economy of Pulse Crop Production in the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 99: 1710-1718. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2006.0314s>.
- Wang X, Yang Y, Pei K, Zhou J, Peixoto L, Gunina A, Zeng Z, Zang H, Rasmussen J, Kuzyakov Y (2021) Nitrogen rhizodeposition by legumes and its fate in agroecosystems: A field study and literature review. *Land Degradation & Development* 32: 410-419. doi: <https://doi.org/10.1002/ldr.3729>.
- Werner RA, Schmidt HL (2002) The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry* 61: 465-484.
- Wilson MG, Sasal MC, Caviglia OP (2013) Critical bulk density for a Mollisol and a Vertisol using least limiting water range: Effect on early wheat growth. *Geoderma* 192: 354-361. doi: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.05.021>.

- Yan M, Pan G, Lavalley JM, Conant RT (2020) Rethinking sources of nitrogen to cereal crops. *Global Change Biology* 26: 191-199. doi: <https://doi.org/10.1111/gcb.14908>.
- Yue K, Peng Y, Peng C, Yang W, Peng X, Wu F (2016) Stimulation of terrestrial ecosystem carbon storage by nitrogen addition: a meta-analysis. *Scientific Reports* 6: 19895. doi: [10.1038/srep19895](https://doi.org/10.1038/srep19895).
- Zeiger C, Egli DB, Leggett JE, Reicosky DA (1982) Cultivar Differences in N Redistribution in Soybeans1. *Agronomy Journal* 74: 375-379. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400020027x>.

ANEXOS

Tabla 2.4. Valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ en estructuras de soja y el cultivo de referencia (maíz) en los estadios R₂, R₅ y R₇ afectados por dos diferentes grupos de madurez (GM) y dos condiciones hídricas contrastantes (CH) durante dos años (A).

GM	CH	2016/17					2017/18				
		Soja				Maíz	Soja				Maíz
		Tallo	Hoja	Carpelos	Semilla		Tallo	Hoja	Carpelos	Semilla	
R ₇											
IV	Riego	0.54	-0.6	-0.31	-0.15	2.89	-1.87	-1.21	-2.41	-0.75	2.18
	Secano	-0.12	-0.48	-0.86	0.04	2.33	-2.25	-1.4	-2.5	-0.25	2.49
V	Riego	0.24	-0.81	0.41	-0.25	2.51	-0.7	-1.34	-1.63	-0.65	2.17
	Secano	0.22	-0.12	0.07	0.12	2.88	-1.77	-1.55	-2.52	-0.22	2.43
R ₅											
IV	Riego	-0.1	-0.09	0.15	-	4.2	0.1	-0.32	0.41	-	3.23
	Secano	0.16	0.23	0.62	-	4.05	-0.55	-0.45	0.12	-	1.54
V	Riego	-0.17	-0.41	0.24	-	4.2	-0.13	-0.33	-0.04	-	3.53
	Secano	0.06	-0.36	0.42	-	4.05	-0.27	-0.55	0.3	-	1.31
R ₂											
IV	Riego	0.74	1.49	-	-	6.25	0.89	1.03	-	-	5.14
	Secano	0.04	0.93	-	-	5	0.64	1.38	-	-	4.67
V	Riego	-0.03	0.12	-	-	6.25	0.97	1.29	-	-	4.93
	Secano	-0.11	0.43	-	-	5	-0.04	0.17	-	-	4.77

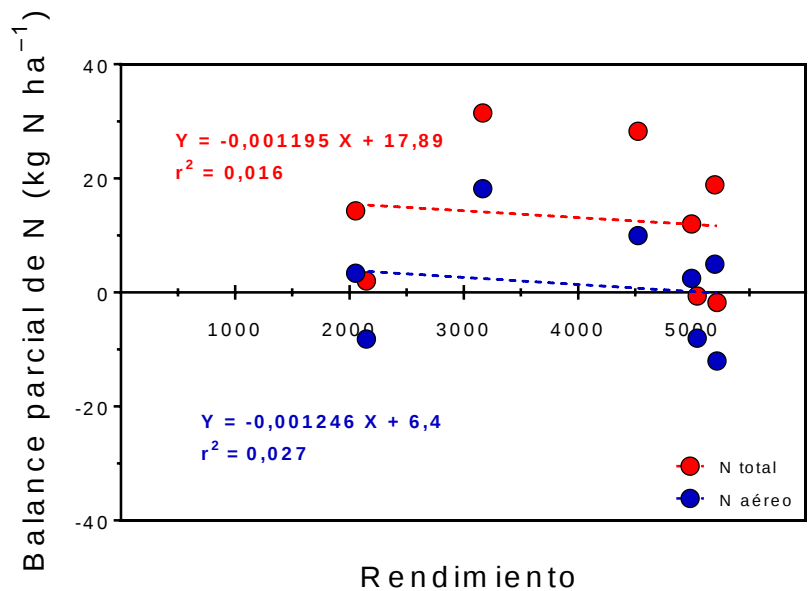


Figura 2.5. Relación entre el balance parcial de N (kg N ha^{-1}) y rendimiento de grano ajustado a un contenido de humedad estándar de 13,5% para el promedio de tratamientos en cada año evaluado. Los puntos rojos y azules representan el N total (incluido el N subsuperficial recuperado hasta una profundidad de 30 cm) y el N aéreo, respectivamente.

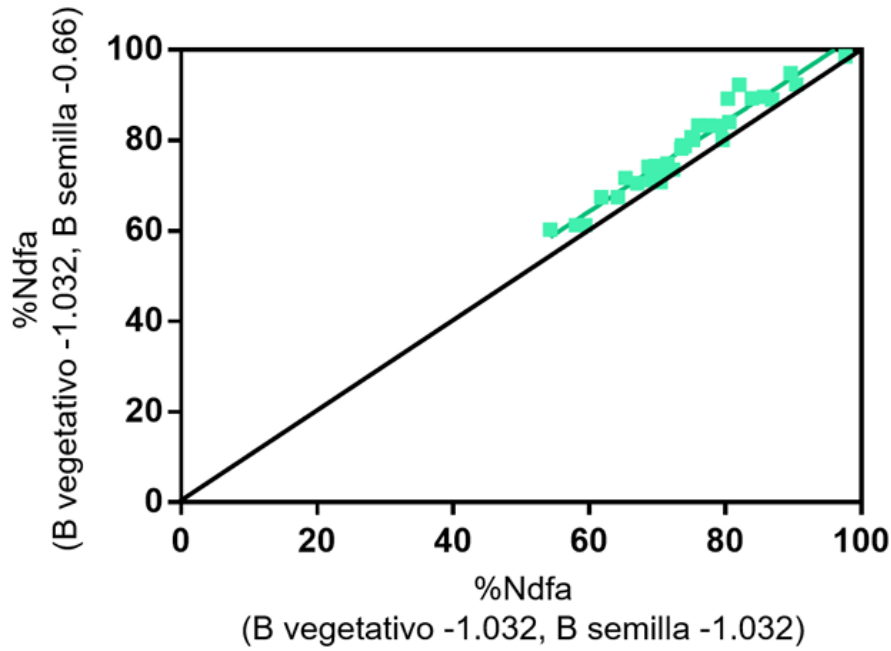


Figura 2.7. Análisis de sensibilidad comparando el uso de diferentes valores B en el cálculo del %Ndfa según Shearer y Kohl (1986). Valores B extraídos de Collino et al., (2015) (-1.032 tanto para la semilla como para la parte aérea), y Bergensen et al., (1992) (valor B de la semilla = -0.66, valor B vegetativo aéreo -1.03).

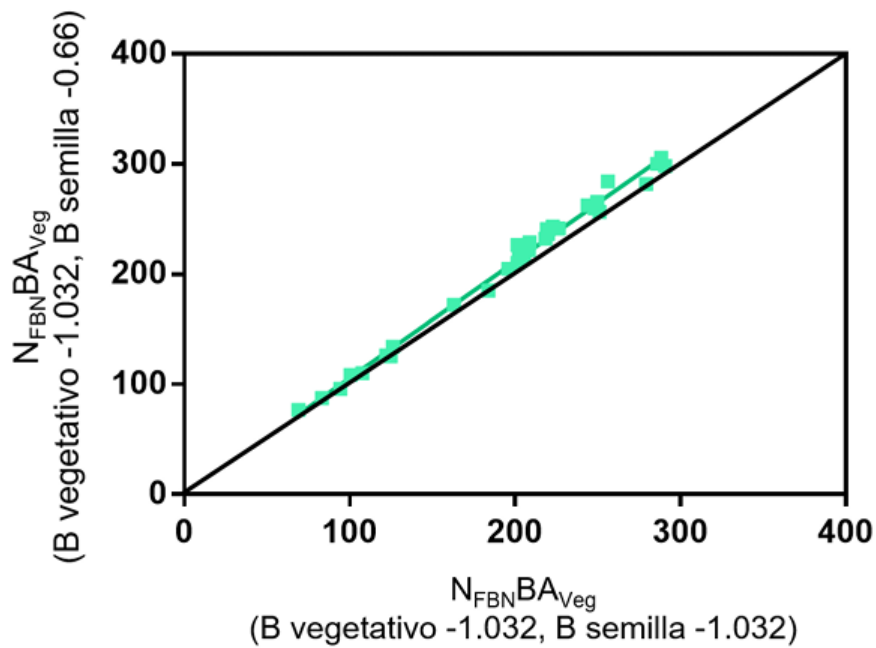


Figura 2.8. Análisis de sensibilidad comparando el uso de diferentes valores de B en el N-FBN en biomasa aérea ($N_{FBN}AB_{Veg}$) (kg N ha⁻¹), según el cálculo de %Ndfa (Shearer y Kohl 1986). Valores B extraídos de Collino et al., (2015) (-1.032 tanto para la semilla como para la parte aérea), y Bergensen et al., (1992) (valor B de la semilla = -0.66, valor B vegetativo aéreo -1.03).

Tabla 3.7. Valores $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ en estructuras de arveja y el cultivo de referencia (trigo) en las fases de vaina plana y madurez fisiológica de dos genotipos diferentes (Facon y Viper).

Cultivares	Vaina plana				Madurez fisiológica				
	Tallos y hojas	Vainas	Raíces y nódulos	Referencia	Tallos y hojas	Carpelos	Semilla	Raíces y nódulos	Referencia
2017									
Facon	1.11	0.67	2.9	2.56	1.07	-0.38	0.45	1.85	1.86
Viper	1.23	2.16	2.7		1.43	0.24	0.93	1.99	
2018									
Facon	0.24	0.96	1.74	1.54	0.38	0	0.91	1	1.42
Viper	0.18	0.8	1.64		0.65	1.48	0.97	1.32	

Tabla 3.8. Valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ en estructuras de vicia y el cultivo de referencia (trigo) en las etapas de plena floración y madurez fisiológica de vicia según se vean afectadas para los diferentes años y fechas de siembra.

Treatments	Floración			Madurez fisiológica			
	Biomasa aérea	Biomasa subsuperficial	Referencia	Biomasa aérea	Semilla	Biomasa subsuperficial	Referencia
2018	0.6	2.18	1.63	1.8	-	1.2	1.84
2019-Temprana	0.67	1.4	1.01	0.99	-2.27	-0.62	0.87
2019-Intermedia	0.48	1.43	1.76	0.74	-1.42	0.37	1.13
2019-Tardía	-0.14	2.29	1.48	0.63	-2.14	-0.57	1.29

Figura 3.5. Relación entre el balance parcial de N incluyendo el N subsuperficial a 30 cm de profundidad con: a) biomasa acumulada en arveja y vicia, y b) rendimiento de grano de arveja ajustado a un contenido de humedad estándar de 13,5%.

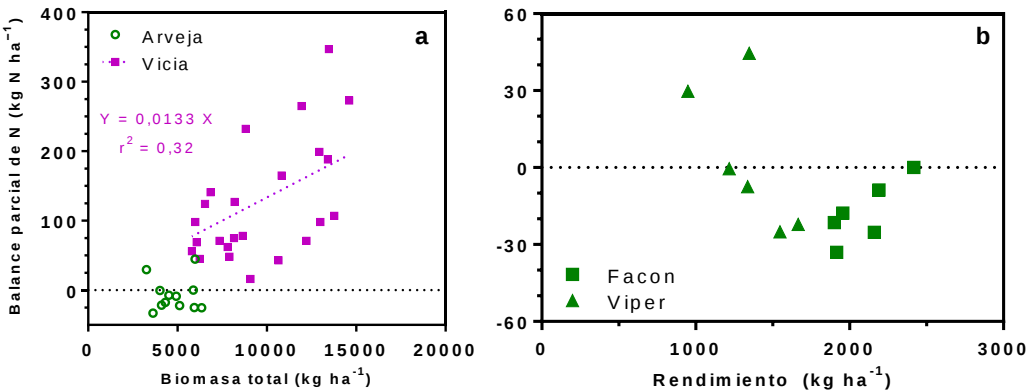


Tabla 4.5. Densidad aparente (Mg cm^{-3}), para las profundidades 0-3,5, 3,5-7,5, 7,5-15, y 15-30 cm, y densidad media ponderada para 0-30 cm, en cada rotación de los ensayos de larga duración 1 (ELD1) y ensayo de larga duración 2 (ELD2).

Rotación	0-3.5	3.5-7.5	7.5-15	15-30	0-30
ELD1					
Arv/Mz-Sj	0.85	1.16	1.20	1.20	1.15
Vic/Mz-Sj	0.84	1.15	1.21	1.22	1.16
Trg/Mz-Sj	0.89	1.19	1.18	1.21	1.17
BB/Mz-Sj	0.88	1.14	1.16	1.21	1.15
Arv/Sj-Sj	0.84	1.14	1.22	1.21	1.16
Vic/Sj-Sj	0.83	1.17	1.22	1.23	1.17
Trg/Sj-Sj	0.85	1.19	1.23	1.21	1.17
BB/Sj-Sj	0.84	1.12	1.19	1.19	1.14
E.E	0.05	0.04	0.02	0.02	0.01
p-valor	0.9839	0.8689	0.1501	0.6572	0.6489
ELD2					
Sj-Sj	0.96	1.17	1.18	1.22	1.18
Sj-CCf-Sj	0.92	1.17	1.18	1.23	1.17
Mz-Sj-Trg/Sj	1.01	1.20	1.17	1.20	1.17
Mz-CC-Sj-Trg/Sj	0.94	1.18	1.17	1.20	1.16
Mz-Trg/Sj	1.05	1.23	1.22	1.24	1.21
Mz-Trg/Sj-CC	0.97	1.17	1.11	1.20	1.15
E.E	0.11	0.06	0.03	0.03	0.03
p-valor	0.96	0.96	0.46	0.89	0.79

Tabla 4.14. Valores medio y análisis de la varianza para carbono acumulado; en biomasa total (C total), grano (C grano), biomasa vegetativa aérea (C veg aéreo), y biomasa vegetativa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad (C veg subsup), para las rotaciones: arveja/maíz-soja (Arv/Mz-Sj), vicia/maíz-soja (Vic/Mz-Sj), Trigo/maíz-soja (Trg/Mz-Sj), barbecho/maíz-soja (BB/Mz-Sj), arveja/soja-soja (Arv/Sj-Sj), vicia/soja-soja (Vic/Sj-Sj), Trigo/soja-soja (Trg/Sj-Sj), barbecho/soja-soja (BB/Sj-Sj).

Rotación	C total	C grano	C veg aéreo	C veg subsup
Mg C ha⁻¹				
Arv/Mz-Sj	38,8 c	15,7 ab	23,1 b	4,3 b
Vic/Mz-Sj	43,4 b	14,1 b	29,4 a	5,1 a
Trg/Mz-Sj	47,8 a	17,1 a	30,7 a	5,3 a
BB/Mz-Sj	38,0 c	15,5 ab	22,4 b	4,5 b
Arv/Sj-Sj	26,9 de	8,9 cd	18,0 c	2,4 d
Vic/Sj-Sj	29,0 d	5,9 e	23,1 b	3,0 c
Trg/Sj-Sj	35,4 c	10,5 c	24,9 b	3,4 c
BB/Sj-Sj	23,6 e	7,6 de	16,0 c	2,3 d
E.E.	1,5	0,6	1,2	0,18
Rotación	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 4.15. Valores medio y análisis de la varianza para nitrógeno acumulado (N) y nitrógeno de fijación biológica (N-FBN) en: biomasa total (Tot), grano (grano), biomasa vegetativa aérea (veg aéreo) y biomasa vegetativa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad (veg subsup), para las rotaciones: arveja/maíz-soja (Arv/Mz-Sj), vicia/maíz-soja (Vic/Mz-Sj), Trigo/maíz-soja (Trg/Mz-Sj), barbecho/maíz-soja (BB/Mz-Sj), arveja/soja-soja (Arv/Sj-Sj), vicia/soja-soja (Vic/Sj-Sj), Trigo/soja-soja (Trg/Sj-Sj), barbecho/soja-soja (BB/Sj-Sj).

Rotación	N Tot abs	N grano	N veg aéreo	N veg subsup	N-FBN total	N-FBN grano	N-FBN veg aéreo	N-FBN veg subsup
	kg N ha ⁻¹							
Arv/Mz-Sj	1615 cd	917 ab	697 b	145 bc	629 d	371 c	258 c	29 d
Vic/Mz-Sj	2183 a	812 cd	1371 a	194 a	972 b	292 c	680 a	63 b
Trg/Mz-Sj	1790 bc	938 a	852 b	160 b	561 d	313 c	248 c	28 d
BB/Mz-Sj	1680 cd	830 bcd	850 b	149 b	685 cd	312 c	373 bc	32 d
Arv/Sj-Sj	1706 cd	931 a	775 b	81 de	1081 ab	599 a	482 b	52 c
Vic/Sj-Sj	1948 b	742 d	1206 a	128 c	1214 a	503 b	711 a	77 a
Trg/Sj-Sj	1778 bc	956 a	822 b	95 d	881 bc	498 b	383 bc	44 c
BB/Sj-Sj	1556 d	877 abc	679 b	75 e	1048 ab	600 a	448 b	51 c
E.E.	71,1	31,5	68,7	6,5	69,4	26,2	56,1	3,5
Rotación	<0,001	<0,01	<0,0001	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,001	<0,0001

Tabla 4.16. Tabla 4.14. Valores medio y análisis de la varianza para carbono acumulado; en biomasa total (C total), grano (C grano), biomasa vegetativa aérea (C veg aéreo), y biomasa vegetativa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad (C veg subsup), para las rotaciones: soja-soja (Sj-Sj), CC/soja (CC/Sj), maíz-trigo/soja (Mz-Trg/Sj) y CC/maíz-trigo/soja (CC/Mz-Trg/Sj).

Rotación	C total	C grano	C veg aéreo	C veg subsup
	Mg C ha ⁻¹			
S-S	42 e	15,8 c	26,25 d	4,1 d
CC/S	54 d	14,9 c	39,61 b	6,0 c
M-S-T/S	64 c	25,9 b	37,81 c	7,5 b
M-CC/S-T/S	66 bc	25,1 b	40,52 b	7,8 b
M-T/S	67 ab	28,3 a	39,06 bc	8,1 a
CC/M-T/S	69 a	26,0 b	43,19 a	8,4 a
E.E.	0,88	0,35	0,54	0,11
	p-valor			
Rotación	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 4.17. Valores medio y análisis de la varianza para nitrógeno acumulado (N) y nitrógeno de fijación biológica (N-FBN) en: biomasa total (Tot), grano (grano), biomasa vegetativa aérea (veg aéreo) y biomasa vegetativa subsuperficial hasta 30 cm de profundidad (veg subsup), para las rotaciones: soja-soja (Sj-Sj), CC/soja (CC/Sj), maíz-trigo/soja (Mz-Trg/Sj) y CC/maíz-trigo/soja (CC/Mz-Trg/Sj).

Rotación	N Tot abs	N grano	N veg aéreo	N veg subsup	N-FBN Total	N-FBN grano	N-FBN veg aéreo	N-FBN subsup
	kg N ha ⁻¹							
S-S	2456 b	1669 a	785 d	133 e	1570 a	1072 a	498 a	85 a
CC/S	2667 a	1562 b	1118 a	173 d	1356 b	941 b	415 b	75 b
M-S-T/S	2393 b	1549 b	844 c	183 c	867 c	581 c	286 c	47 c
M-CC/S-T/S	2413 b	1486 b	927 b	193 ab	911 c	633 c	278 c	51 c
M-T/S	2150 c	1382 c	767 d	188 bc	614 d	427 d	188 d	31 d
CC/M-T/S	2332 b	1354 c	978 b	201 a	650 d	445 d	205 d	33 d
E.E.	42,8	27,2	17,2	2,6	39,7	26,5	14,6	1,95
	p-valor							
Rotación	<0,001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

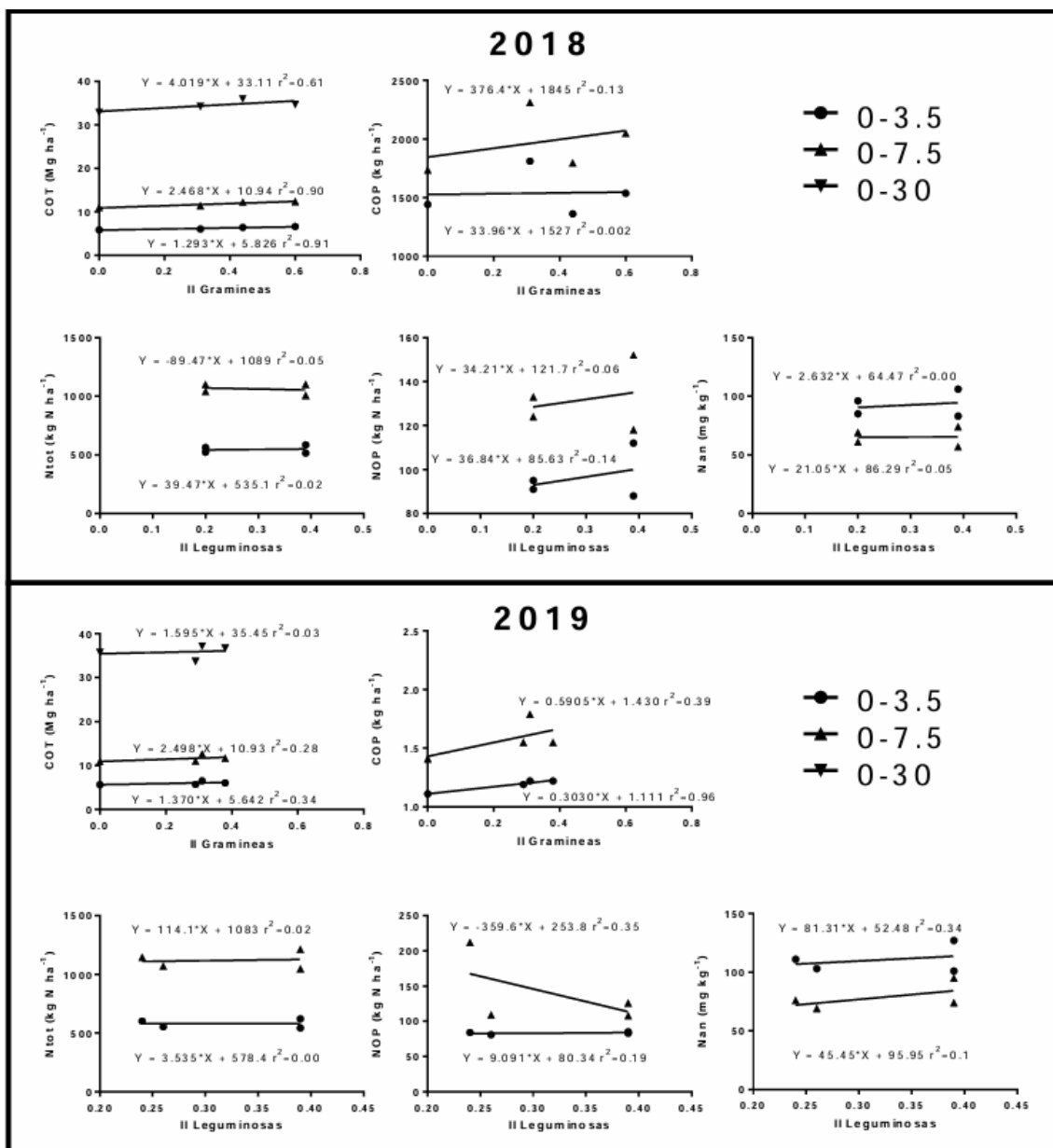


Figura 4.15. Relación entre índice de intensificación de gramíneas (II Gramíneas) y valores finales de carbono orgánico total (COTme), y carbono orgánico particulado (COPme), y relación entre índice de intensificación de leguminosas con niveles finales de N total (Ntot), nitrógeno orgánico particulado (NOP) y nitrógeno potencialmente mineralizable en anaerobiosis (Nan). Se presentan los resultados para rotaciones analizadas en 2018 y 2019.

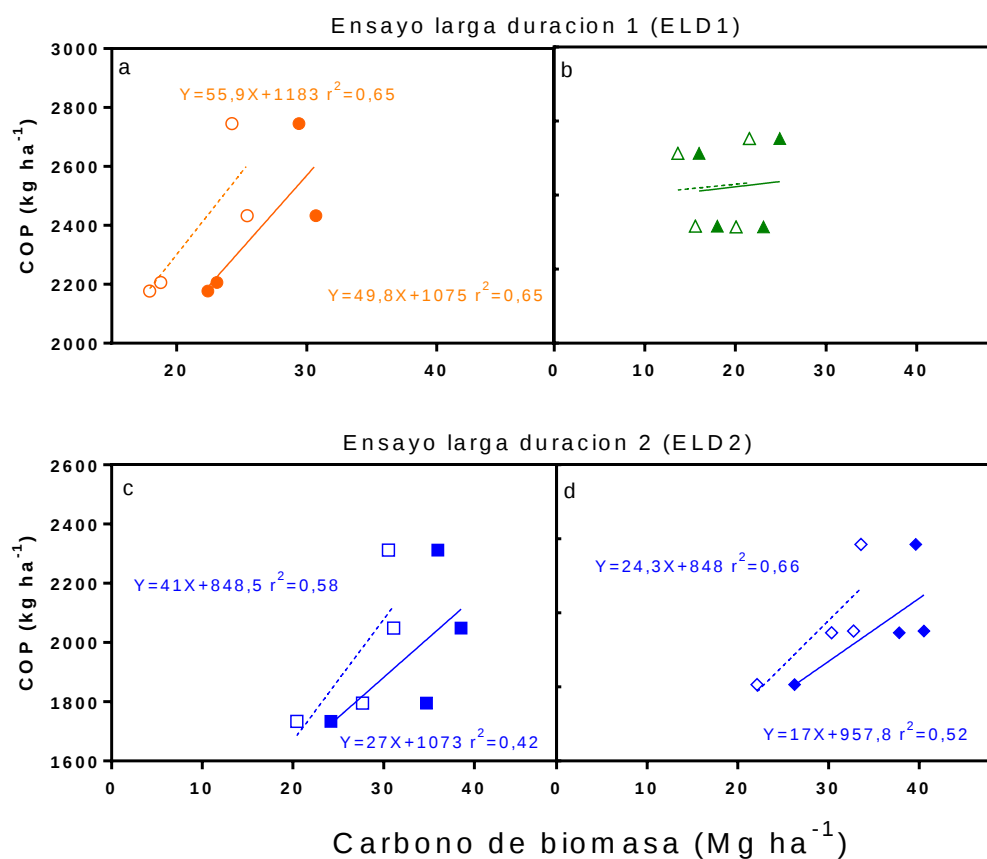


Figura 4.16. Relación del carbono orgánico particulado del suelo hasta 7,5 cm de profundidad (COP) y carbono acumulado en residuos vegetativos aéreos (símbolos vacíos) y carbono acumulado en residuos vegetativos totales incluyendo raíces (símbolos llenos), para los dos ensayos de larga duración. a) rotaciones del ELD1 con maíz, b) rotaciones del ELD1 con soja de segunda, c) rotaciones del ELD2 evaluadas en 2018 y d) rotaciones del ELD2 evaluadas en 2019.