



Terra Latinoamericana

E-ISSN: 2395-8030

terra@correo.chapingo.mx

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo,
A.C.
México

Delgadillo-Martínez, J.; Ferrera-Cerrato, R.; Galvis-Spínola, A.; Hernández-Garay, A.; Cobos-Peralta, M.A.

Fijación biológica de nitrógeno en una pradera de trébol hubba/ballico de corte o de pastoreo

Terra Latinoamericana, vol. 23, núm. 1, enero-marzo, 2005, pp. 73-79

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.

Chapingo, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57323110>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN UNA PRADERA DE TRÉBOL HUBBA/BALLICO DE CORTE O DE PASTOREO

Biological Nitrogen Fixation in a Cut or Grazed Hubba Clover/Ryegrass Sward

J. Delgadillo-Martínez^{1‡}, R. Ferrera-Cerrato¹, A. Galvis-Spínola¹, A. Hernández-Garay² y M.A. Cobos-Peralta²

RESUMEN

Se comparó el manejo (corte *versus* pastoreo por ovinos) en una asociación de trébol hubba (*Melilotus albus*)-ballico perenne (*Lolium perenne*) en la producción de materia seca (MS) y fijación biológica de N₂ atmosférico. Se realizaron cuatro ciclos de corte pastoreo. Con manejo por corte se mejoró la producción de MS acumulada en los cuatro ciclos (11.4 t ha⁻¹ de MS con 35.06% de trébol hubba) en comparación con el pastoreo (9.6 t ha⁻¹ de MS con 37.30% de trébol hubba). La fijación de N₂ por rizobios en simbiosis con trébol hubba fue similar en corte que en pastoreo; pero, la población de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre en la rizosfera de ballico fue mayor en pastoreo que en corte.

Palabras clave: *Melilotus albus*, *Lolium perenne*, praderas asociadas, leguminosas, gramíneas, fijación de nitrógeno, *Rhizobium*.

SUMMARY

The influence of sheep grazing or cutting on dry matter (DM) yield and biological N₂ fixation in a plant association composed of hubba clover (*Melilotus albus*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) was evaluated. Four cutting or grazing cycles were carried out. During these four experimental cycles, DM was higher in the cutting treatment (11.4 t ha⁻¹ containing 35.06% hubba clover) than in the grazing treatment (9.6 t ha⁻¹, containing 37.30% hubba clover). N₂ symbiotic fixation was similar in both cutting and grazing treatments. However, the population of N₂ fixing bacteria of the rhizosphere of ryegrass was higher in the grazing treatment than in the cutting treatment.

¹ Instituto de Recursos Naturales, ² Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. 56230 Montecillo, Texcoco, Estado de México.

[‡] Autor responsable (juliandm@colpos.mx)

Recibido: Enero de 2002. Aceptado: Septiembre de 2004.
Publicado en *Terra Latinoamericana* 23: 73-79.

Index words: *Melilotus albus*, *Lolium perenne*, associated swards, legumes, gramineae, nitrogen fixation, *Rhizobium*.

INTRODUCCIÓN

El ciclo global del nitrógeno está constituido por cinco fases primarias: mineralización, nitrificación, desnitrificación, fijación biológica e inmovilización. La actividad humana ha influido en la mayoría de los procesos que componen estas fases; en especial, la fijación del abundante y estable N₂ molecular, que representa 79% de la atmósfera en formas aprovechables para los cultivos (Echegaray-Alemán, 1995). De importancia agropecuaria es la contribución de rizobios que fijan N₂ atmosférico [hasta 200 kg ha⁻¹ año⁻¹ de N (Bolger *et al.*, 1995)] de manera simbiótica en nódulos de la mayoría de las plantas de la familia *Fabaceae*. Estas cantidades pueden sustituir, en parte, la fertilización química nitrogenada; pero, para que el ingreso de N₂ sea de tal magnitud, deben de cumplirse condiciones favorables para la leguminosa y sus microsimbiontes (Dear *et al.*, 1996), como: temperatura, pH, humedad, contenido de N-inorgánico, Fe, Co, Mo y P en el suelo (Ofosu-Budu *et al.*, 1992; Hardarson, 1993). Además, las gramíneas mantienen en su rizosfera un hábitat ideal para la proliferación de bacterias de vida libre fijadoras de N₂ atmosférico. Entre los géneros conocidos con esta función están: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Echegaray-Alemán, 1995). La fijación de N₂ por estos microorganismos puede ser de 10 a 90 kg ha⁻¹ año⁻¹ en gramíneas cuyos exudados radicales y las condiciones ambientales favorezcan a estas bacterias (Chanway *et al.*, 1990).

En praderas asociadas (leguminosas y gramíneas), la fijación simbiótica de N₂ atmosférico depende de la proporción de las leguminosas (Matches, 1989; Burton y DeVane, 1992; Ledgard y Steele, 1992; Fothergill y Davies, 1993). El pastoreo de ovinos o bovinos reduce la fijación de N₂ en comparación con equinos y caprinos (Gong *et al.*, 1996; Del Pozo *et al.*,

1996). Algunos autores concuerdan en que el pastoreo favorece la fijación simbiótica de N_2 atmosférico (Sandford *et al.*, 1995) y otros indican que el pastoreo la reduce o inhibe (Saunders, 1984; Ledgard y Steele, 1992; Wheeler *et al.*, 1997), en comparación con el manejar las praderas asociadas por corte. Debido a esta polémica, el presente trabajo se planteó para indicar los efectos en producción de materia seca y fijación biológica de N_2 atmosférico debido a estos tipos de manejo en una pradera de trébol hubba con ballico perenne, evaluando, a su vez, la función de los microorganismos de vida libre fijadores de N_2 atmosférico asociados a la rizosfera de ballico, de los cuales existe poca información en praderas de leguminosas-gramíneas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Campo Montecillo del Colegio de Postgraduados, ubicado a $19^{\circ} 27' 30''$ N y $98^{\circ} 54' 14''$ O, y 2241 m de altitud. Trece días antes de la siembra, se realizó un muestreo para la determinación de características químicas iniciales del suelo. Se determinó pH en agua 1:2 suelo/agua (7.9), conductividad eléctrica (0.42 dS m^{-1}), K intercambiable [23.5 mg kg^{-1} de suelo seco (Mehlich, 1984)] y P-Olsen [29 mg kg^{-1} de suelo seco (Olsen y Dean, 1965)].

Se estableció una asociación de trébol hubba (*Melilotus albus*) y ballico perenne (*Lolium perenne*) en condiciones de riego. El trébol hubba se inoculó con seis cepas de *Rhizobium meliloti*. Las cepas Cp1 y Cp89, pertenecientes a la colección Microbiana Internacional del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados y las cepas Cpmex173, Cpmex176, Cpmex177, Cpmex178 y Cpmex179 provenientes de suelos de Nochistlán, Oaxaca. Se realizaron cortes de homogeneización de la altura de las plantas a 30 cm, a 90 y 130 días después de la siembra (dds). A 160 dds iniciaron los ciclos de corte/pastoreo, los cuales fueron cuatro. El área de cada unidad experimental fue de 125 m^2 . Se incluyeron dos tratamientos con cinco repeticiones: 1) aprovechamiento por corte, realizando éste aproximadamente a 15 cm de altura y 2) aprovechamiento por pastoreo, el cual fue rotativo con un día de ocupación y 20 días de descanso. Se pastorearon borregos criollos con un peso entre 23 y 44 kg estableciendo una asignación de forraje de 10 a 12%. Se utilizó cerco eléctrico para delimitar las unidades experimentales en este tratamiento.

Variables Evaluadas

Producción de materia seca vegetal. Un día antes y un día después de realizar el corte/pastoreo de la pradera, se tomó una muestra (tres repeticiones por unidad experimental) del forraje presente, con la utilización de un cuadro de alambón de 0.25 cm^2 arrojado al azar dentro de la unidad experimental. Con este material se formó una muestra compuesta por tratamiento. Se separó el material vegetal fresco para pesarlo y determinar la composición botánica de la pradera. El material separado se secó a 75°C en horno con extracción de aire (Salvis, Modelo Thermocenter 100X) durante 48 h. Se sacó del horno y se pesó. Se determinó el peso seco del forraje ofrecido (antes del corte/pastoreo) y residual (después del corte/pastoreo); además, se calculó el forraje aprovechado, siendo éste el resultado de sustraer el forraje residual al ofrecido.

Fijación simbiótica de N atmosférico en trébol hubba. Se determinó la reducción de acetileno (Lee *et al.*, 1977) en raíces de trébol hubba (cinco plantas de cada tratamiento) un día antes de cada ciclo de corte/pastoreo. Para determinar la cantidad de acetileno/etileno, se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian 2440 con detector de ionización de flama y columna de 2 m de largo y 1/8 de pulgada de diámetro, empacada con Porapak N). Además, las raíces utilizadas en esta determinación se lavaron con agua corriente para luego separar, contar y pesar el número de nódulos no-senescentes. Se calculó la reducción de acetileno por planta (fijación total) y por gramo de nódulos secados a 70°C durante 48 h (fijación específica).

Población de bacterias de vida libre fijadoras de N atmosférico en rizosfera de ballico. En los cuatro ciclos de corte/pastoreo, se determinó el tamaño de la población de bacterias de vida libre fijadoras de N_2 atmosférico por el método del número más probable (NMP). Para esto, se realizaron diluciones decimales del suelo rizosférico y éstas se sembraron por quintuplicado en tubos de ensayo con tapón de algodón (Pochon y Tardeux, 1962), que contenían 2 mL del medio de cultivo con fuente combinada de carbono [Solución A: 0.8 g de K_2HPO_4 , 0.2 g de KH_2PO_4 , 0.1 g de NaCl, 0.028 g de $Na_2\text{-Fe-EDTA}$, 0.025 g de $Na_2MoO_4\cdot H_2O$, 0.025 g de extracto de levadura, 5 g de manitol, 0.5 mL de lactato de sodio a 60%, 900 mL de agua destilada y 2 mL de una solución alcohólica de azul de bromotimol a 0.5%.

Solución B: 0.2 g de $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.06 g de $CaCl_2$ y 100 mL de agua destilada. Cada solución se ajusta a pH 7, se esterilizan por separado a 18 lbs plg^{-2} durante 18 min. Una vez tibias, se mezclan y se les adiciona 5 μg de biotina, 19 μg de ácido *p*-aminobenzoico y 40 μg de actidiona (Rennie, 1981)]. Se incubaron los tubos a 27 °C por 72 h. Se consideraron positivos los tubos en los que el medio de cultivo cambió de color azul turquesa a amarillo o a azul rey y negativos los tubos en los que el medio de cultivo no cambió de color. Los cálculos de NMP se realizaron de acuerdo con las tablas de Alexander (1982).

Análisis estadístico. El experimento se ajustó a un modelo completamente al azar con dos tratamientos y cinco repeticiones y se analizó mediante la prueba de Tukey de comparación de medias con 5% de significancia, en el programa de cómputo SAS, Versión 6.12 (SAS Institute, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de Materia Seca Vegetal

La pradera produjo más fitomasa total al aprovecharse por corte que por pastoreo ($P > 0.05$), siendo 11.4 t ha^{-1} de materia seca (MS) con 35.06% de trébol hubba y 9.6 t ha^{-1} de MS con 37.30% de trébol durante los cuatro ciclos en corte y pastoreo, respectivamente. Asimismo, la producción de trébol hubba fue similar ($P < 0.05$) al aprovechar la pradera por corte que por pastoreo, 4.0 y 3.7 t ha^{-1} de MS, respectivamente. Pero, la producción de ballico fue mayor ($P > 0.05$) al aprovecharla por corte con 7.4 t ha^{-1} de MS que por pastoreo con 6.0 t ha^{-1} de MS. Jiménez y Martínez (1985) mencionaron que, en comparación con el corte, cuya eficiencia de aprovechamiento es de hasta 97%, en pastoreo se produce menor cantidad de forraje, pues su eficiencia de aprovechamiento es de 60% o menor. Sin embargo, la producción mayor en corte que en pastoreo pudo deberse a que la asignación de forraje de 10 a 12% inhibió el rebrote vigoroso del trébol; ya que Sanford *et al.* (1995) reportaron que, en una pradera de *Trifolium subterraneum* asociada a *Arctotheca calendula*, la producción de forraje en pastoreo fue de 11.8 y en corte de 7.8 t ha^{-1} de MS. Esto lo atribuyeron a que, en el tratamiento de pastoreo, la carga animal fue 25% menor que la recomendada, por lo que el contenido de la leguminosa no fue menor que 30% durante el ciclo de experimentación. Además, indicaron que en pastoreo se afectó el área

foliar residual de la leguminosa menos que en corte, por lo que en pastoreo se presentó un rebrote más vigoroso. En el presente trabajo, el trébol hubba fue afectado por las defoliaciones en ambos tratamientos, ya que el contenido de esta leguminosa se redujo de 67 a 12% en corte y de 88 a 5% en pastoreo (Figura 1).

Fijación Simbiótica de N_2 en Trébol Hubba

La fijación de N_2 atmosférico por rizobios en simbiosis con trébol hubba, promedio de los cuatro ciclos, fue similar ($P < 0.05$) en corte que en pastoreo, con 1.83 y 1.36 nmol de C_2H_4 producidos $planta^{-1} h^{-1}$, respectivamente. Wheeler *et al.* (1997) mencionaron que la fijación de N_2 atmosférico en praderas de *Trifolium spp./ballico* perenne fue mayor en corte con 65 kg ha^{-1} de N que en pastoreo con 35 kg ha^{-1} de N e indicaron que con la asignación de 10%, el pastoreo redujo la persistencia de la leguminosa en la pradera. Por lo contrario, Unkovich *et al.* (1998) mencionaron que pastoreos intensos (16 borregos ha^{-1}) fuerzan el consumo del pasto, y no sólo el de las leguminosas, por lo que aumenta el rebrote de las leguminosas y la fijación de N_2 atmosférico de éstas, en comparación con pastoreos menos intensos (8 borregos ha^{-1}) y con corte. Sandford *et al.* (1995) mencionaron que la fijación de N_2 atmosférico por *Trifolium subterraneum* aumenta con la intensidad de pastoreo, hasta un límite en el que el sobrepastoreo inhibe el rebrote y la fijación de N_2 atmosférico. En el presente trabajo, la fijación de N_2 atmosférico se relacionó ($R^2 = 0.98$) con el porcentaje de trébol hubba en la pradera (Figura 1), por lo que, al reducirse la persistencia de la leguminosa en la pradera, se inhibió la fijación simbiótica de N_2 atmosférico en ambos tratamientos. Lo anterior indica que el trébol hubba no soportó el corte a 15 cm de altura, ni el pastoreo con asignaciones de 10 a 12% y, con esto, la fijación de N_2 atmosférico también se redujo. Kishinevski *et al.* (1992) reportaron el efecto del corte en la reducción de la fijación simbiótica de N_2 atmosférico en *Trifolium alexandrinum* y mencionaron que la inoculación con *Rhizobium trifoli* provocó un aumento de 39% de la materia seca al primer corte en comparación con los tratamientos sin inocular; pero, en cortes sucesivos, la producción de materia seca fue similar en tratamientos inoculados y no-inoculados. Sin embargo, Bolger *et al.* (1995) y Peoples *et al.* (1995) consideraron que la fijación de N_2 atmosférico es afectada principalmente por la humedad del suelo

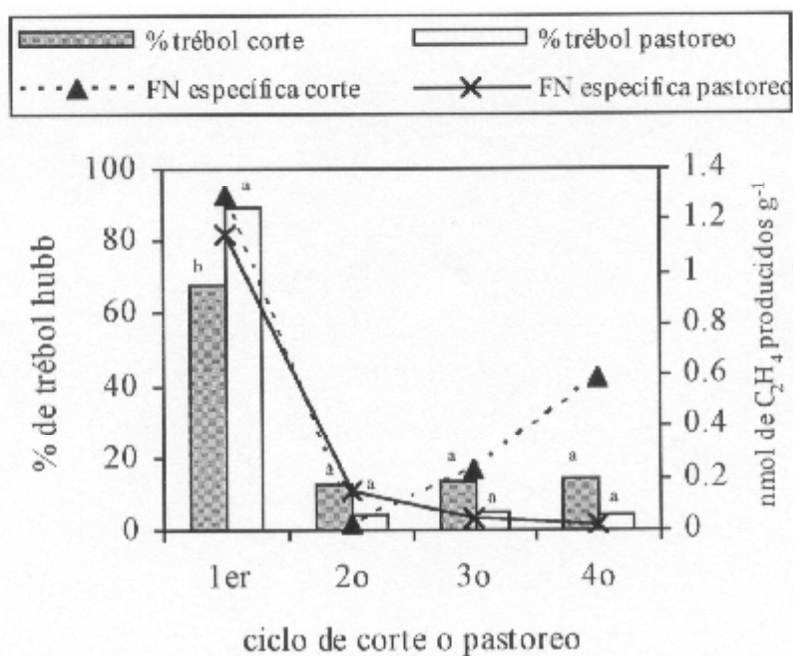


Figura 1. Contenido de trébol hubba y fijación específica de N₂ atmosférico en una pradera asociada de trébol hubba y ballico perenne (promedio de cinco repeticiones).

FN = fijación simbiótica de N₂ atmosférico. Letras distintas en columnas del mismo ciclo indican diferencias estadísticas entre corte y pastoreo (Tukey, $\alpha = 0.05$).

y no por factores de la planta, lo cual no es el caso de los resultados del presente trabajo, ya que la pradera se manejó con riegos y los suelos siempre tuvieron humedad adecuada.

El número de nódulos fue similar en ambos tratamientos; en promedio de los cuatro ciclos se presentaron 38.9 y 36.7 nódulos planta⁻¹ en corte y pastoreo, respectivamente. El número de nódulos no presentó descensos marcados (Figura 2) durante los cuatro ciclos de corte/pastoreo en comparación con lo ocurrido con la fijación simbiótica de N₂ atmosférico. Lo anterior indica que los nódulos se formaron, pero después del primer ciclo de experimentación no fueron efectivos.

La fijación específica de N₂ atmosférico (producción de C₂H₄ planta⁻¹ h⁻¹ dividida entre el peso seco de los nódulos de la planta) se redujo drásticamente en el segundo ciclo de corte/pastoreo (Figura 2).

Bacterias de Vida Libre Fijadoras de N₂ Atmosférico en Rizosfera de Ballico

En el tratamiento de pastoreo se presentó mayor ($P > 0.05$) número de microorganismos de vida libre fijadores de N₂, en comparación con el tratamiento de corte del segundo al cuarto ciclo de corte/pastoreo. En el primer ciclo, la población fue similar ($P < 0.05$) en ambos tratamientos (Cuadro 1).

Ghani-Nugroho y Kuwatsuka (1992) mencionaron que la aplicación de materia orgánica al suelo incrementa el número de microorganismos de vida libre fijadores de N₂. El tamaño de esta población microbiana estuvo correlacionado ($R^2 = 0.75$) con la cantidad de N₂ fijado por leguminosas, sólo cuando la materia orgánica aplicada tiene una relación C/N mayor que 51. Cuando se aplican materiales orgánicos con más N, la respuesta es variable.

Cuadro 1. Población de bacterias de vida libre fijadoras de N₂ atmosférico en rizosfera de raygras perenne asociado a trébol hubba.

Ciclo de corte/pastoreo	Corte [†]			Pastoreo		
	Li	media	Ls	Li	media	Ls
----- NMP X 10 ³ bacterias de vida libre fijadoras de N ₂ g ⁻¹ de suelo seco -----						
1er	5.12	^x 16.90 a	55.70	4.48	^x 14.80 b	48.84
2o	0.71	^y 2.35 b	7.75	3.81	^x 12.60 b	41.58
3o	0.32	^y 1.07 b	3.53	6.75	^x 22.30 a	73.59
4o	0.29	^y 0.98 b	3.23	6.71	^x 22.15 a	74.28

[†] Li = límite inferior y Ls = límite superior del NMP con 95% de confianza. Promedio de cinco repeticiones con la misma letra (a,b) en la misma columna o con el mismo subíndice (^{x,y}) en la misma fila son estadísticamente iguales (Tukey, α = 0.005).

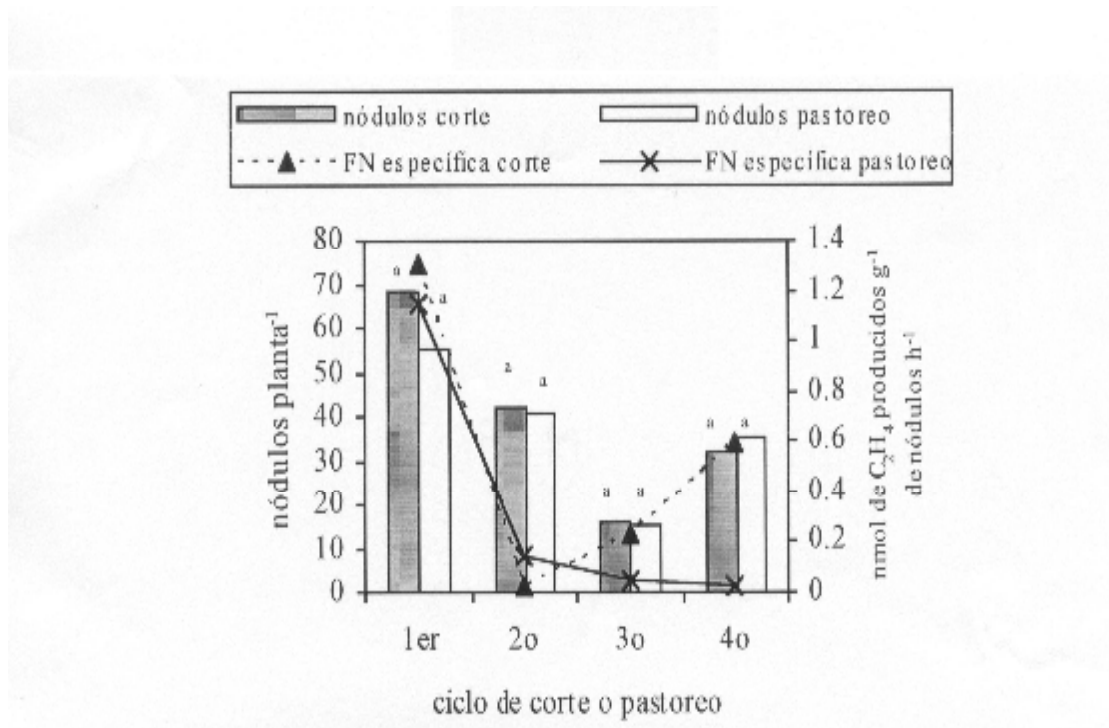


Figura 2. Número de nódulos y fijación específica de N₂ atmosférico en trébol hubba en asociación con ballico perenne, durante cuatro ciclos de corte/pastoreo (promedio de cinco repeticiones).

FN = fijación simbiótica de N₂ atmosférico Letras distintas en columnas del mismo ciclo indican diferencias estadísticas entre corte y pastoreo (Tukey, α = 0.05).

Por lo anterior, es posible que, en el presente trabajo, el aporte de heces en el tratamiento de pastoreo haya estimulado el crecimiento de la población de bacterias de vida libre fijadoras de N₂ en la rizosfera de ballico.

Wiehe y Hoflich (1995) mencionaron que la mayoría de las bacterias promotoras del crecimiento de la rizosfera de muchos cultivos se establecen en la fase vegetativa (10⁴ a 10⁵ UFC g⁻¹ de raíz), pero durante la maduración de las plantas, la población de estos microorganismos se reduce (10² UFC g⁻¹ de raíz). Además, estos autores indicaron que los rizobios

y las bacterias fijadoras de N₂ atmosférico de vida libre se establecen en la rizosfera de los cultivos durante todo el ciclo vegetativo y su establecimiento no depende del aporte de materiales orgánicos al suelo, sino de interacciones moleculares entre los microorganismos y los exudados radicales. Los datos del Cuadro 1 no soportan esa aseveración, ya que, en pastoreo, las bacterias fijadoras de N₂ de vida libre no se establecieron durante todo el año en el tratamiento de corte. Sin embargo, en pastoreo, donde hubo aporte de materia orgánica por las heces de los borregos, esta

población sí se estableció durante todo el ciclo de experimentación.

CONCLUSIONES

- El contenido de trébol hubba en la pradera se redujo drásticamente al manejarla por corte a una altura aproximada de 15 cm y también por pastoreo con una asignación de 10 a 12%, por lo que se recomienda dejar una mayor área foliar remanente para asegurar su persistencia en asociación con ballico. Debido a lo anterior, la fijación simbiótica de N₂ atmosférico se redujo drásticamente después del primer ciclo de corte pastoreo.

- El factor que más influenció la fijación de N₂ atmosférico por los rizobios en simbiosis con trébol hubba fue la defoliación de esta leguminosa.

- La población de bacterias de vida libre fijadoras de N₂ atmosférico fue mayor en pastoreo que en corte; además, en pastoreo se mantuvo la población de estos microorganismos en los cuatro ciclos, mientras que en corte, la población se redujo desde el segundo ciclo. Lo anterior puede atribuirse al aporte de compuestos carbonados por las excretas de los ovinos que favorecieron el desarrollo de fijadores libres de N₂ atmosférico.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1982. Most probable number method for microbial populations. pp. 815-820. *In*: Page, A.L. (ed.). Methods for soil analysis. Agronomy 9, Parte II. Soil Science Society of America. Madison, WI.
- Bolger, T.P., J.S. Pate, M.J. Unkovich y N.C. Turner. 1995. Estimates of seasonal nitrogen fixation of annual subterranean clover based pastures using the 15N natural abundance technique. *Plant Soil* 175: 57-66.
- Burton, G.W. y E.H. DeVane. 1992. Growing legumes with coastal bermudagrass in the lower coastal plain. *J. Prod. Agric.* 5: 278-281.
- Chanway, C.P., F.B. Holl y R. Turkington. 1990. Specificity of associations between *Bacillus* isolates and genotypes of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* from a grass/legume pasture. *Can. J. Bot.* 68: 1126-1130.
- Dear, B.S., J.M. Virgona y G. Sutherland. 1996. Legumes in low input perennial pastures of southern Australia: Historical role and future development. *N.Z. J. Agric. Res.* 39: 579-589.
- Del Pozo, M., L.A. Wrigth, T.K. White y P.M. Colgrove. 1996. Effects of grazing by sheep or goats on sward composition in ryegrass/white clover pasture and on subsequent performance of weaned lambs. *Grass Forage Sci.* 51: 142-154.
- Echegaray-Alemán, A. 1995. Ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. pp. 7-35. *In*: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez-Moreno (eds.). *Agromicrobiología: Elemento útil en agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.
- Fothergill, M. y D.A. Davies. 1993. White clover contribution to continuously stocked sheep pastures in association with contrasting perennial ryegrasses. *Grass Forage Sci.* 48: 369-379.
- Ghani-Nugroho, S. y S. Kuwatsuka. 1992. Concurrent observation of several processes of nitrogen metabolism in soil amended with organic materials. II. Effect of farmyard manure on ammonification, nitrification, denitrification and N₂ fixation at different levels of soil moisture. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 63-73.
- Gong, Y., J. Hodgson, M.G. Lambert e I.L. Gordon. 1996. Short term ingestive behavior of sheep and goats grazing grasses and legumes, I. Comparison of bite weight, bite rate and bite dimensions for forages at two stages of maturity. *N.Z. J. Agric. Res.* 39: 63-73.
- Hardarson, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil* 152: 1-17.
- Jiménez, A. y P.A. Martínez. 1985. Utilización de praderas. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, estado de México.
- Kishinevski, B.D., Y. Leshem, Y. Friedman y G. Krivatz. 1992. Yield and nitrogen fixation of berseem clover as a potential winter forage crop under semiarid conditions. *Arid Soil Res. Rehabilitation* 6: 261-270.
- Ledgard, S.F. y K.W. Steele. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant Soil* 141: 137-153.
- Lee, K.B., V. Alimagno y T. Yoshida. 1977. Field technique using the acetylene reduction method to assay nitrogenase activity and its association with rice rhizosphere. *Plant Soil* 47: 519-526.
- Matches, A.G. 1989. A survey of legume production and persistence in United States. pp. 37-44. *In*: Marten, G.C., A.G. Matches, R.F. Barnes, R.W. Brougham, R.J. Clements y G.W. Sheats (eds.). *Persistence of forage legumes*. American Society of Agronomy. Madison, WI.
- Mehlich, A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15: 1409-1416.
- Ofosu-Budu, K.G., S. Ogata y K. Fujita. 1992. Temperature effects on root nodule activity and nitrogen release in some subtropical and temperate legumes. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 717-726.
- Olsen, S.R. y L.A. Dean. 1965. Phosphorus. pp. 1035-1049 *In*: Black, C.A. (ed.). *Methods of soil analysis. Part II*. American Society of Agronomy. Madison, WI.
- Peoples, M.B., D.M. Lilley, V.F. Burnett, A.M. Ridley y D.L. Garden. 1995. Effects of surface application of lime and superphosphate to acid soils on growth and N₂ fixation by subterranean clover in mixed swards. *Soil Biol. Biochem.* 27: 663-671.
- Pochon, J. y P. Tardeux. 1962. *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Editions de la Tourelle. Saint Mandé, France.
- Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
- Sandford, P., J.S. Pate, M.J. Unkovich y A.N. Thompson. 1995. Nitrogen fixation in grazed and ungrazed subterranean clover pasture in South West Australia assessed by the 15N natural abundance technique. *Austr. J. Agric. Res.* 46: 1427-1443.

- SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT Guide for Personal Computers. Cary, NC.
- Saunders, M.H. 1984. Mineral composition of soil and pasture from areas of grazed paddocks, affected and unaffected by dung and urine. *N.Z. J. Agric. Res.* 27: 405-412.
- Unkovich, M., P. Sandford, J. Pate y M. Hyder. 1998. Effects of grazing on plant and soil nitrogen relations of pasture crop rotations. *Austr. J. Agric. Res.* 49: 475-485.
- Wheeler, D.M., D.C. Edmeades y J.D. Morton. 1997. Effect of lime on yield, N fixation and plant N uptake from the soil by pasture on 3 contrasting trials in New Zealand. *N.Z. J. Agric. Res.* 40: 397-408.
- Wiehe, W. y G. Hoflich. 1995. Survival of plant growth promoting rhizosphere bacteria in the rhizosphere of different crops and migration to non-inoculated plants under field conditions in North East Germany. *Microbiol. Res.* 150: 201-206.