

## USO DE DISTINTAS PLANTAS DE REFERENCIA EN LA ESTIMACION DE LA FIJACION DE NITROGENO EN ALFALFA POR EL METODO DE DILUCION ISOTOPICA

G SIERRA, A LAZZARI, M GOMEZ

LAHBIS - Dto. de Agronomía - Universidad Nacional del Sur - 8000 Bahía Blanca - Argentina.  
E-mail: alazzari@criba.edu.ar

### USE OF DIFFERENT REFERENCE PLANTS ON THE ESTIMATION OF NITROGEN FIXATION IN ALFALFA BY THE ISOTOPIC DILUTION TECHNIQUE

We investigated the effect of using different reference plants (*Dactylis glomerata* L., *Lolium perenne* L. and *Eragrostis curvula* L.) to quantify the proportion of nitrogen in alfalfa derived from biological N<sub>2</sub> fixation (%NDDA) by the isotope dilution technique, using soil with ammonium sulfate at 9,811 atom % <sup>15</sup>N excess provided in split applications. The soil used was a Typic Haplustoll, pH 6.5. Plants were grown in a pot experiment and five harvests were achieved. We have compared the partitioning of fixed N<sub>2</sub> among herbage and roots of alfalfa at the last harvest. The %NDDA assessed by the different reference plants averaged 70 % at the first harvest. During the second and third harvest intervals, alfalfa derived 80 % of its N from fixation, and then declined in the fourth and fifth harvests, with *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne* as reference plant. *Eragrostis curvula* presented lower estimates of %NDDA in the second, third and fourth harvests. During the study period, the total amount of N<sub>2</sub> fixed averaged 114 mg N plant<sup>-1</sup>. In the last harvest the herbage of alfalfa contained the same proportion of fixed N<sub>2</sub> compared with the whole plant.

**Key words:** Alfalfa - nitrogen fixation - reference plant - isotopic dilution

### INTRODUCCION

Una importante característica de las leguminosas es su habilidad para fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con la bacteria *Rhizobium*. De esta forma, pueden crecer en suelos poco fértiles sin la adición de fertilizantes nitrogenados. Esto es de relevancia en nuestro país, donde el costo de la tecnología de fertilización es elevado. La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una de las leguminosas forrajeras de mayor importancia en Argentina, teniendo una alta incidencia económica en las explotaciones primarias. Datos recientes muestran una superficie cultivada de 4,9 millones de hectáreas en la Región Pampeana (Hijano, Navarro 1995).

De las técnicas disponibles para cuantificar la FBN, la de dilución isotópica de <sup>15</sup>N es considerada la más confiable pudiendo, si es utilizada cuidadosamente, estimar la proporción de nitrógeno derivado de la FBN en sucesivas cosechas de leguminosas perennes (Heichel *et al.* 1981). Para aplicar esta técnica es necesario adicionar un compuesto marcado con <sup>15</sup>N al suelo, y luego asumir que, tanto la planta fijadora como

otra no fijadora (control o de referencia) obtendrán nitrógeno de ese suelo con el mismo enriquecimiento isotópico de <sup>15</sup>N (Chalk 1985). Si la composición isotópica del nitrógeno mineral del suelo es uniforme en el espacio y constante en el tiempo, todos los cultivos acumularán nitrógeno con el mismo enriquecimiento de <sup>15</sup>N. Consecuentemente, podría usarse cualquier planta no fijadora, como control, para cualquier cultivo fijador de nitrógeno (Witty 1983).

La dificultad de mantener constante la concentración de <sup>15</sup>N en el espacio no es de relevancia en estudios que se realizan en macetas, debido a su pequeño volumen. La mayor dificultad, especialmente en pasturas perennes, es lograr esa concentración uniforme en el tiempo, del nitrógeno mineral durante todo el período del ensayo. Puede aplicarse una sola dosis de fertilizante enriquecido en <sup>15</sup>N, a la siembra de los cultivos (Danso 1988). Sin embargo, como existe una continua mineralización del nitrógeno no marcado del suelo, que surte de nuevo al reservorio de nitrógeno mineral marcado, es inevitable que el enriquecimiento de <sup>15</sup>N de

este reservorio decaiga con el tiempo (Hamilton *et al.* 1992). Labandera *et al.* (1988) mostraron que las aplicaciones repetidas de  $^{15}\text{N}$  a la misma parcela, proporcionaron buenas estimaciones de la FBN en pasturas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Por otro lado, para que el cultivo de referencia acumule nitrógeno del suelo con el mismo enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  que el fijador, ambos deben tener el mismo modelo de absorción de nitrógeno del suelo (Witty 1983).

Debido a la dificultad de seleccionar el cultivo de referencia apropiado, Boddy *et al.* (1990) sugirieron usar varias plantas control para conocer la precisión de la estimación. Además, como las condiciones climáticas y edáficas son distintas entre los diferentes estudios, se alterarían diferencialmente los modelos de absorción de nitrógeno del suelo (+ fertilizante) de los distintos cultivos. No contándose con una aislónea no nodulante como planta de referencia, una buena alternativa sería usar la misma leguminosa no inoculada (Rennie 1982). Pero su uso dependerá de la ausencia absoluta de especies nativas de *Rhizobium* en el suelo (Chalk 1985).

En base a lo expuesto, se propuso cuantificar la proporción de nitrógeno derivado del aire (%NDDA) en alfalfa, mediante el empleo de la técnica isotópica, usando tres cultivos de referencia: raigrás (*Lolium perenne* L.), ampliamente usado para la cuantificación de la FBN en alfalfa (Hardarson *et al.* 1988) y en otras leguminosas (Ledgard *et al.* 1985), pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.) (West, Wedin 1985) y pasto llorón (*Eragrostis curvula* L.). Esta última gramínea fue utilizada por primera vez por Lázari *et al.* (1996), en la estimación de la FBN en alfalfa asociada con pasto llorón. Estos autores propusieron realizar estudios adicionales para determinar la conveniencia del uso de esta gramínea como planta de referencia, siendo esto uno de los objetivos del presente trabajo.

La mayoría de las estimaciones de la FBN se basan en el análisis de la biomasa aérea solamente. Sin embargo, debido a probables diferencias en los enriquecimientos de  $^{15}\text{N}$  entre los órganos aéreos y los terrestres, excluir las raíces en la cuantificación podría conducir a errores de diferente magnitud en los valores

de fijación. Consecuentemente, en esta experiencia se incluyó el objetivo adicional de detectar el error que podría surgir de no incluir las raíces en la estimación de la FBN en alfalfa.

## MATERIALES Y METODOS

Las macetas se llenaron con 6 kg de suelo Haplustol Típico, de textura franco arenoso-arcilloso liviana, con las siguientes características: 6,5 de pH, 0,086% de N, 1,5% de materia orgánica y 7 mg  $\text{kg}^{-1}$  de P extractable. La siembra de la leguminosa y las tres plantas de referencia, previa fertilización con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g P maceta<sup>-1</sup>) se realizó el 12/08/97, a razón de cuatro por maceta. La adición de fertilizante marcado consistió de una dosis inicial de solución de  $(^{15}\text{NH}_4)\text{SO}_4$  conteniendo 9,811 % a e  $^{15}\text{N}$ , en el estadio de emergencia de la alfalfa, a razón de 10 kg N  $\text{ha}^{-1}$ . A partir de la primera cosecha se hicieron seis aplicaciones más (cada 15 días), a razón de 2,5 kg N  $\text{ha}^{-1}$ , totalizando 25 kg N  $\text{ha}^{-1}$ . Todas las adiciones se realizaron por intermedio de un tubo relleno con algodón, de 15 mm de diámetro, colocado en el centro de cada maceta, hundido hasta la mitad de la altura del suelo y que contuvo agujeros de 7 mm en sus paredes para permitir una lenta difusión de la solución con fertilizante marcado. Las macetas se regaron con agua destilada cada dos días, hasta el segundo corte de las plantas; luego, diariamente, hasta el final del experimento. Todas las macetas se rotaron periódicamente en forma aleatoria.

La inoculación del suelo se realizó con la cepa B323 de *Rhizobium meliloti*. Se hicieron dos inoculaciones previas a la siembra, separadas quince días, y reinoculaciones después de cada cosecha. Se empleó una suspensión bacteriana de  $1 \cdot 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , con una tasa de 50 mL por maceta.

En cada cosecha se cortó la biomasa aérea de las plantas, a tres cm sobre la superficie del suelo, cuando la alfalfa estuvo entre 1 y 3% de floración. Debido a la dificultad de la recuperación de las raíces, se analizaron sólo las raíces después de la quinta y última cosecha. Para ello, las macetas se invirtieron y todas las raíces (con nódulos) se recuperaron manualmente y lavaron suavemente con agua destilada. Las muestras de material vegetal se secaron ( $65^\circ\text{C}$ , 48hs), pesaron, molieron (0,85mm) y analizaron para nitrógeno total por digestión Kjeldhal (destilación por arrastre de vapor en 0,1 N HCl, titulación con 0,1 N NaOH y concentración del destilado, previa adición de gotas de HCl). Todos los cortes y las moliendas se hicieron en orden creciente de enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$ . La concentración de  $^{15}\text{N}$  fue determinada con espectrómetro de emisión Jasco, modelo N150 (Japón), utilizando previamente el método Dumas

para la transformación del  $\text{NH}_4^+$  a gas  $\text{N}_2$  en el tubo de descarga (Fiedler, Proksch 1975)

El porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación en alfalfa, durante un intervalo de tiempo entre cosechas, se calculó según Mc Auliffe *et al.* (1958):

$$\% \text{NDDA} = (1 - \% a e^{15}\text{N en planta fijadora} / \% a e^{15}\text{N en planta no fijadora}) \cdot 100,$$

donde *a* e se refiere a los átomos en exceso de  $^{15}\text{N}$  en órganos idénticos (biomasa aérea o raíces) de la planta fijadora y de la no fijadora.

El % *a e*  $^{15}\text{N}$  de la planta entera, necesario para estimar la cantidad de nitrógeno fijado (NDDA) en la planta entera de alfalfa, surgió del siguiente promedio ponderado (Danso, Kumarasinghe 1990), donde *NT* indica gramos de nitrógeno total, y *ba* y *r* indican biomasa aérea y raíces, respectivamente:

$$\% a e^{15}\text{N planta entera} = \% a e^{15}\text{N ba} \cdot \text{NT ba} + \% a e^{15}\text{N r} \cdot \text{NT r} / \text{NT ba} + \text{NT r}$$

El diseño experimental fue completamente aleatorizado y constó de dos factores, planta y tiempo de cosecha, con cuatro y cinco niveles, respectivamente. En cada corte se analizó la totalidad de la biomasa aérea de las macetas (cinco réplicas), correspondientes a cada tratamiento. En la última cosecha se incluyó la extracción de raíces. Los datos se analizaron estadísticamente por análisis de la varianza. Se utilizaron los tests de rango estudentizado Tukey y SNK para la comparación a posteriori de las medias.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 1A se presentan los valores de acumulación de materia seca de la biomasa aérea de los cuatro cultivos, observándose que el raigrás y el pasto ovillo, y el pasto llorón y la alfalfa hasta la cuarta cosecha, acumularon igual cantidad de materia seca, respectivamente ( $P > 0,10$ ). En comparación con las otras gramíneas, el pasto llorón tuvo inicialmente un crecimiento lento y rebrotos vigorosos después de las cosechas. La mayor acumulación de nitrógeno en alfalfa ( $P < 0,01$ ), desde la segunda cosecha, es consistente con una importante contribución de la FBN al nitrógeno total de la leguminosa, y con una baja disponibilidad de nitrógeno mineral del suelo (Figura 1B).

Como se observa en la Figura 1C, los % *a e*  $^{15}\text{N}$  de las cinco cosechas de la biomasa aérea de alfalfa fueron inferiores a los

respectivos porcentajes de las plantas de referencia ( $P < 0,01$ ), indicando que la leguminosa fijó nitrógeno del aire. Al mismo tiempo, las concentraciones de  $^{15}\text{N}$  estarían señalando que la alfalfa absorbió una proporción constante de nitrógeno del aire, en casi todo el período bajo estudio ( $P > 0,10$ ), a excepción de la cuarta cosecha. A su vez, para cada una de las plantas de referencia, existieron diferencias significativas de la composición isotópica entre cosechas ( $P < 0,01$ ), excepto para el llorón (Figura 1C). Es decir que la concentración de  $^{15}\text{N}$  del nitrógeno mineral del suelo no fue constante en el tiempo. La caída abrupta final (entre las dos últimas cosechas) coincidió con la no adición de nitrógeno marcado. La mineralización del nitrógeno nativo del suelo pudo causar un reemplazo del nitrógeno mineral marcado, provocando una disminución pronunciada del enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  del suelo, en ese último período del ensayo. Por último, para un mismo momento de cosecha se observaron diferencias significativas entre los enriquecimientos de  $^{15}\text{N}$  de las distintas plantas de referencia, particularmente en el tercer y cuarto cortes ( $P < 0,01$ ). Esto indicaría diferencias en las relaciones de absorción de nitrógeno del suelo y del fertilizante entre las mismas.

Usando diferentes plantas de referencia, fue posible calcular tres estimaciones de las proporciones de nitrógeno en alfalfa derivado de la FBN. En la Tabla 1 puede observarse que el %NDDA en alfalfa, utilizando pasto ovillo y raigrás como control, presentó una tendencia de aumento desde la primera a la segunda cosecha, manteniéndose en este valor hasta la tercera cosecha (*ca.* 80%), para luego declinar hasta el final. Esto coincide con lo experimentado por Henson, Heichel (1984), quienes obtuvieron el mayor %NDDA en un cultivo de alfalfa, durante la mitad de su estación de crecimiento. El uso del pasto llorón como control proporcionó, salvo en el primer y quinto cortes, valores más bajos de %NDDA. Sin embargo, esto no invalida el uso de esta planta como referencia para estimar la FBN en alfalfa, dado que mostró uniformidad en el enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  a lo largo de todo el ensayo ( $P < 0,05$ ) (Figura 1C). Descartando la última cosecha,

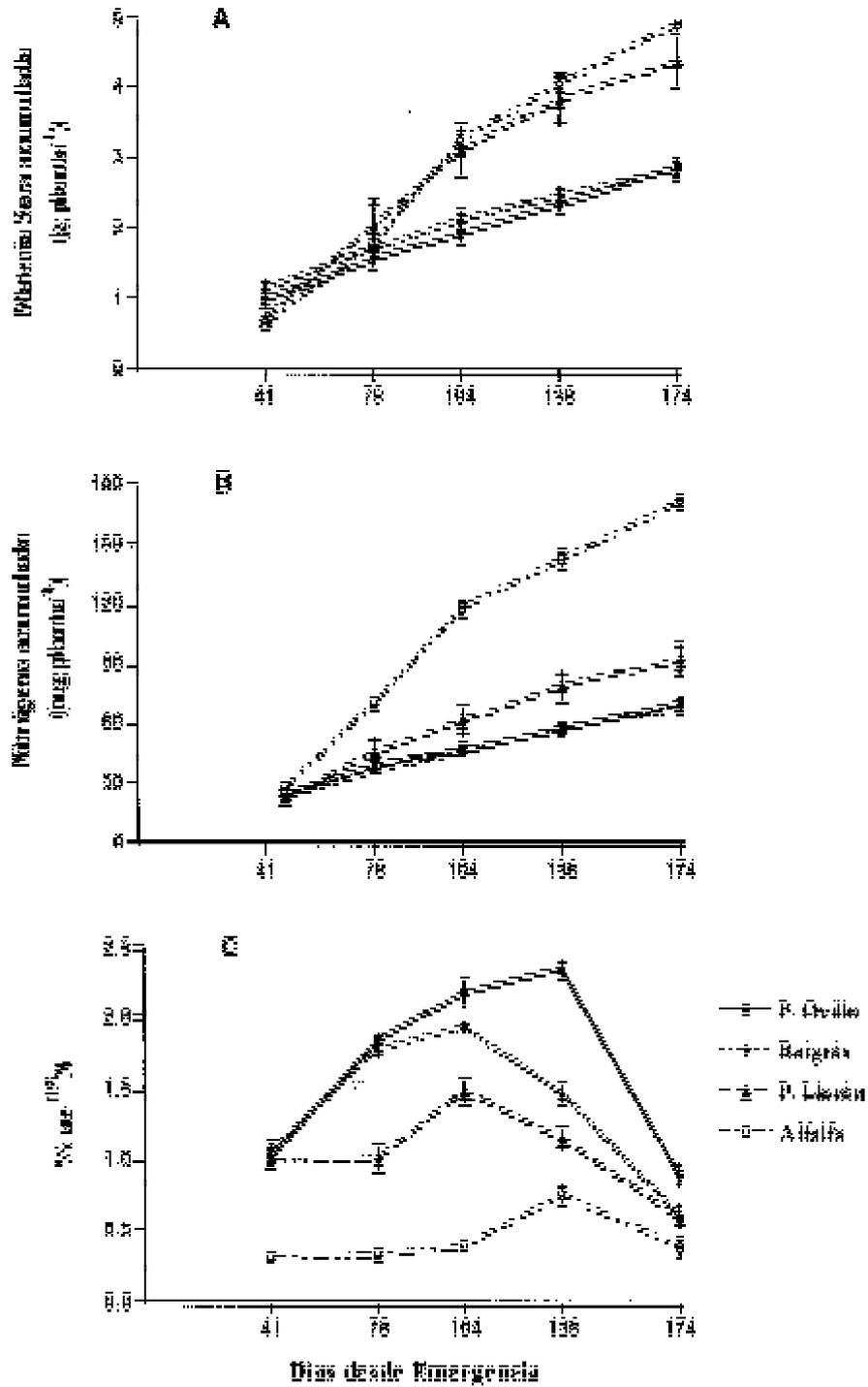


Figura 1. Acumulación de materia seca (A) y nitrógeno (B), y concentración de  $^{15}\text{N}$  (C) de alfalfa y de tres plantas de referencia, crecidas en macetas y fertilizadas con aplicaciones parciales de urea marcada con  $^{15}\text{N}$ . Medias de cinco réplicas. Las barras indican errores estándares de las medias.

Figure 1. Dry matter (A) and nitrogen (B) accumulation, and  $^{15}\text{N}$  enrichment (C) of alfalfa and reference plants grown in pots with split applications of labelled urea. Values are means of five replicates. Bars designate mean standard error.

debido a la ya señalada caída abrupta final en el enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  (Figura 1C), con el pasto llorón se obtuvo un promedio de %NDDA de 60,3, valor que resultó inferior a los promedios obtenidos con el raigrás (69,9%) y el pasto ovillo (74,7%), respectivamente ( $P < 0,05$ ).

En el primer corte, las tres estimaciones brindaron valores de %NDDA sin diferencias significativas ( $P > 0,10$ ), lo que se relaciona con los enriquecimientos de  $^{15}\text{N}$  similares de las tres referencias ( $P > 0,10$ ) (Figura 1C). Las diferencias entre las composiciones isotópicas de las plantas control, no siempre se tradujeron en diferencias entre los valores calculados de %NDDA de la leguminosa (Tabla 1). Por ejemplo, en la tercera cosecha, la concentración de  $^{15}\text{N}$  de la biomasa aérea de pasto ovillo y raigrás fueron diferentes ( $P < 0,01$ ), mientras que los %NDDA de alfalfa, calculados con esas dos referencias, fueron similares ( $P > 0,10$ ). O sea que, para

valores altos de %NDDA, las estimaciones con varias referencias fueron relativamente insensibles a las pequeñas diferencias en los enriquecimientos de  $^{15}\text{N}$  entre ellas, coincidiendo con lo observado por Boddy, Urquiaga (1992).

La inclusión del rendimiento en las estimaciones de NDDA no afectó las diferencias halladas entre las proporciones de nitrógeno fijado (Tabla 1). Para el período del ensayo, la cantidad total promedio de NDDA en alfalfa, calculado con las tres referencias, ascendió a 114 mg N por planta de alfalfa, igual al promedio obtenido con el raigrás.

La Tabla 2 muestra que la composición isotópica de la biomasa aérea de alfalfa fue estadísticamente similar a aquella de sus raíces y, consecuentemente, a aquella de la planta entera ( $P > 0,10$ ). O sea que no existió, al menos en el último período entre cosechas, una partición preferencial de  $\text{N}_2$  simbiótico hacia las raíces. Si esto fuera una

Tabla 1. Proporción y rendimiento de nitrógeno del aire (NDDA) en la biomasa aérea de alfalfa. Valores obtenidos utilizando tres plantas de referencia.

Table 1. Proportion and amount of fixed nitrogen (NDDA) in the alfalfa aerial biomass. Values obtained with three reference plants.

DDE	NDDA (%)			NDDA (mg $\text{pl}^{-1}$ )		
	Pasto ovillo	Raigrás	Pasto llorón	Pasto ovillo	Raigrás	Pasto llorón
41	68,6 ± 2,9 a*	71,2 ± 2,7 a	68,6 ± 2,9 a	18,9 ± 0,8 a	19,6 ± 0,9 a	18,9 ± 0,8 a
76	81,3 ± 1,7 a	80,8 ± 1,7 a	66,2 ± 3,0 b	34,7 ± 1,5 a	34,5 ± 1,5 a	28,3 ± 1,1 b
104	81,4 ± 0,4 a	79,5 ± 0,4 a	72,7 ± 0,8 b	39,1 ± 2,9 a	38,1 ± 2,9 a	34,7 ± 2,4 b
136	67,4 ± 2,6 a	48,0 ± 4,1 b	33,6 ± 3,3 c	16,5 ± 1,8 a	11,8 ± 1,8 b	8,3 ± 1,8 c
174	56,5 ± 6,5 a	37,0 ± 9,4 b	35,1 ± 9,7 b	16,3 ± 3,6 a	10,8 ± 3,8 b	10,3 ± 3,8 b
Total				125,2 ± 3,6 a	114,8 ± 3,8 b	100,5 ± 3,8 c
Media	71,0 ± 6,5 a	63,0 ± 9,4 b	55,24 ± 9,7 c			

Los valores son medias de cinco réplicas ± su desvío estándar. DDE: Días desde la emergencia de la alfalfa. Los valores medios de la fila acompañados de letras diferentes difieren significativamente entre si (Tukey, SNK,  $P < 0,05$ ).

Values are means of five replicates ± standard deviation. DDE: days after emergence of the alfalfa. Values in the same file followed by different letters differ significantly at  $P < 0,05$  (Tukey, SNK).

Tabla 2. Enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  de la biomasa aérea, raíces y planta entera de alfalfa y de tres plantas de referencia. Datos correspondientes a la quinta cosecha.

Table 2.  $^{15}\text{N}$  enrichment of the aerial biomass, roots and the whole-plant of alfalfa and three reference plants. Data from the fifth harvest.

Cultivo	Biomasa aérea	Raíces	Planta entera
Alfalfa	0,390 ± 0,059 a	0,332 ± 0,082 a	0,353 ± 0,062 a
Pasto ovilla	0,898 ± 0,084 a	0,811 ± 0,054 a	0,858 ± 0,047 a
Raigrás	0,619 ± 0,085 a	0,828 ± 0,079 b	0,684 ± 0,075 a
Pasto llorón	0,601 ± 0,038 a	0,727 ± 0,029 b	0,654 ± 0,037 ab

Los valores son media de cinco réplicas ± su desvío estandard. Los valores medios de la fila acompañados de letras diferentes difieren significativamente entre si (Tukey, SNK,  $P < 0,05$ )

Values are means of five replicates ± standard deviation. Values in the same file followed by different letters differ significantly at  $P < 0.05$  (Tukey, SNK).

Tabla 3. Proporción y rendimiento de nitrógeno fijado del aire (NDDA) en la biomasa aérea, raíces y planta entera de alfalfa, utilizando tres gramíneas como planta de referencia. Datos correspondientes a la quinta cosecha.

Table 3. Proportion and amount of fixed nitrogen (NDDA) in the aerial biomass, roots and the whole-plant of alfalfa. Values obtained with three reference plants. Data from the fifth harvest.

Parte de la planta de alfalfa	NDDA (%)			NDDA ( $\text{mg pl}^{-1}$ )		
	Pasto ovilla	Raigrás	Pasto llorón	Pasto ovilla	Raigrás	Pasto llorón
Biomasa aérea	56,5 ± 6,5 b	37,0 ± 9,4 a	35,1 ± 9,7 a	16,4 ± 3,6 bc	10,8 ± 3,8 c	10,3 ± 3,8 c
Raíces	59,0 ± 10,1 b	59,9 ± 9,8 b	54,3 ± 10,2 b	14,4 ± 4,3 bc	14,6 ± 4,3 c	13,3 ± 4,3 c
Planta entera	58,8 ± 7,1 b	48,4 ± 8,9 ab	46,0 ± 9,4 ab	31,2 ± 5,9 a	25,7 ± 6,4 a	24,5 ± 26,5 a

Los valores son media de cinco réplicas ± su desvío estandard. Los valores medios de la fila o columna acompañados de letras diferentes difieren significativamente entre si (Tukey, SNK,  $P < 0,05$ ).

Values are means of five replicates ± standard deviation. Values in the same file or column followed by different letters differ significantly at  $P < 0.05$  (Tukey, SNK).

constante en el tiempo, la estimación del %NDDA podría obtenerse desde el herbaje y no desde la planta entera. El pasto ovillo también presentó un marcado isotópico uniforme, lo que explica los estadísticamente similares %NDDA en las partes de la planta de alfalfa, utilizando esta referencia ( $P > 0,10$ ) (Tabla 3). Contrariamente, tanto el raigrás como el pasto llorón, presentaron significativamente mayor enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  en las raíces respecto a la parte aérea ( $P < 0,01$ ). Esto podría deberse a la formación secuencial de las partes de estas plantas no fijadoras, así como también a un cambio de enriquecimiento del nitrógeno disponible del suelo. Esto determinó que se observaran diferencias significativas entre el %NDDA de la biomasa aérea y el de las raíces de alfalfa, cuando se usaron dichas gramíneas (raigrás y llorón) como control (Tabla 3). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en los %NDDA en la leguminosa, con o sin las raíces (biomasa aérea vs. planta entera), con ninguna de las referencias empleadas ( $P > 0,10$ ).

Aún cuando los %NDDA de la biomasa y de la planta entera de alfalfa no difirieran a lo largo de todo su período de crecimiento, usar sólo el herbaje para los cálculos de NDDA podría brindar estimaciones considerablemente diferentes a los valores calculados del análisis de las plantas enteras (Tabla 3). La magnitud del error dependerá de las diferencias en el rendimiento de materia seca y nitrógeno entre el herbaje y las raíces (más nódulos).

Sobre la base examinada, ningún cultivo de referencia en particular fue más apropiado que otro para la estimación del %NDDA en alfalfa, por el método de dilución isotópica. Descartando la última cosecha, la única diferencia cuantitativa fue que el pasto llorón brindó estimaciones, generalmente, más bajas que los otros controles. Para estimar el %NDDA en alfalfa no sería necesario analizar las raíces. Sin embargo, si se requiriera estimar la cantidad total de  $\text{N}_2$  fijado por la leguminosa, debería incluirse el análisis de las mismas.

#### AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue subsidiado por la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/063F).

Agradecemos al Ing. Agr. A. Gargano por el asesoramiento en el manejo de las plantas.

#### REFERENCIAS

- Boddy RM, Urquiaga S, Neves MCP, Suhet AR, Peres JR. 1990. Quantification of contribution of  $\text{N}_2$  fixation to field-grown grain legumes. A strategy for the practical application of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. *Soil Biol. Biochem.* 22:649-655.
- Boddy RM, Urquiaga S. 1992. Calculations and assumptions involved in the use of the "A value" and  $^{15}\text{N}$  isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological  $\text{N}_2$  fixation. *Plant and Soil* 145:151-155.
- Chalk PM. 1985. Estimation of the  $\text{N}_2$ -fixation by isotope dilution: An appraisal of techniques involving  $^{15}\text{N}$  enrichment and their application. *Soil Biol. Biochem.* 17:389-410.
- Danso SKA. 1988. The use of  $^{15}\text{N}$ -enriched fertilizer for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. En: Beek DP, Materon LA Editores. *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean Agriculture*. Nijhoff, Dordrecht. 345-358.
- Danso SKA, Kumarasinghe KS. 1990. Assessment of potential sources of error in nitrogen fixation measurements by the nitrogen-15 isotope dilution technique. *Plant and Soil* 125: 87-93.
- Fiedler R, Proksch G. 1985. The determination of  $^{15}\text{N}$  by emission and mass spectrometry in biological analysis: A review. *Anal. Chim. Acta* 78:1-62.
- Hamilton SD, Smith CJ, Chalk PM, Hopmans P. 1992. A model based on measurement of soil and plant  $^{15}\text{N}$  enrichment to estimate  $\text{N}_2$  fixation by soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in pots. *Soil Biol. Biochem.* 24:71-78.
- Hardarson G, Danso SKA, Zapata F. 1988. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. *Crop Sci.* 28:101-105.
- Heichel GH, Barnes DK, Vance CP. 1981. Nitrogen fixation of alfalfa in the seeding year. *Crop Sci.* 21:330-335.
- Henson RA, Heichel GH. 1984. Partitioning of symbiotically fixed nitrogen in soybeans and alfalfa. *Crop Science* 24:986-990.
- Hijano EH, Navarro A Editores. 1995. *La alfalfa en la Argentina*. Enciclopedia Agro de Cuyo. Manual 11. INTA CR. Cuyo. Editorial San Juan. 281 pp.
- Labandera C, Danso SKA, Pastorini D, Curbelo S, Martín V. 1988. Nitrogen fixation in a white clover-fescue pasture using three methods of nitrogen-15 application and residual nitrogen-

- 15 uptake. *Agron. J.* 80:265-268.
- Lázzari MA, Gargano AO, Aduriz MA. 1996.  $^{15}\text{N}$  estimates of dinitrogen fixation in alfalfa-weeping lovegrass swards under field conditions. *Rev. Arg. Microbiol.* 28:175-181.
- Ledgard SF, Simpson JR, Freney JR, Bergensen FJ. 1985. Effect of reference plant on estimation of nitrogen fixation by subterranean clover using  $^{15}\text{N}$  methods. *Aust. J. Agric. Res.* 36:663-676.
- McAuliffe C, Chamblee DS, Uribe-Arago H, Woodhouse Jr. WW. 1958. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by  $^{15}\text{N}$ . *Agron. J.* 55:334-337.
- Rennie RJ. 1982. Quantification dinitrogen fixation by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution: The question of the nonfixing control plant. *Can. J. Bot.* 60:856-861.
- West CP, Wedin W F. 1985. Dinitrogen fixation in alfalfa-orchardgrass pastures. *Agron. J.* 77:89-94.
- Witty JF. 1983. Estimating  $\text{N}_2$ -fixation in the field using  $^{15}\text{N}$ -labelled fertilizer: Some problems and solutions. *Soil Biol. Biochem.* 15:631-639.