



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia

Programa de Posgrado en Producción Animal

TRANSFERENCIA DE NITRÓGENO DEL
TRÉBOL BLANCO AL OVILLO MEDIANTE PASTOREO

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL MORENO CARRILLO



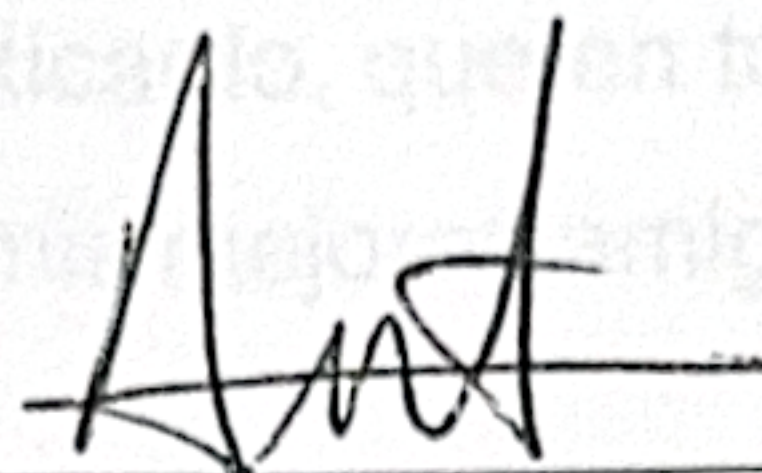
Diciembre de 2007
Chapingo, Estado de México

"TRANSFERENCIA DE NITRÓGENO DEL TRÉBOL BLANCO AL OVILLO MEDIANTE PASTOREO"

Tesis realizada por **MIGUEL ANGEL MORENO CARRILLO** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

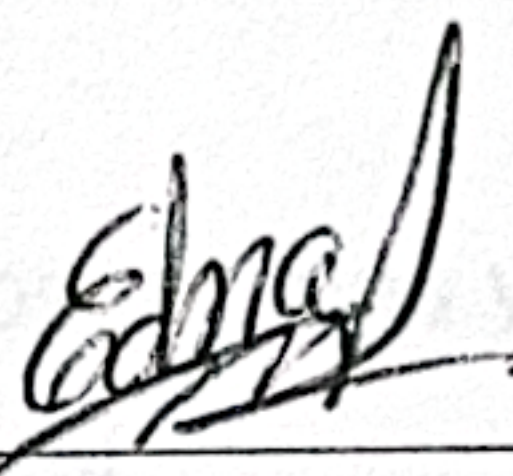
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

DIRECTOR:



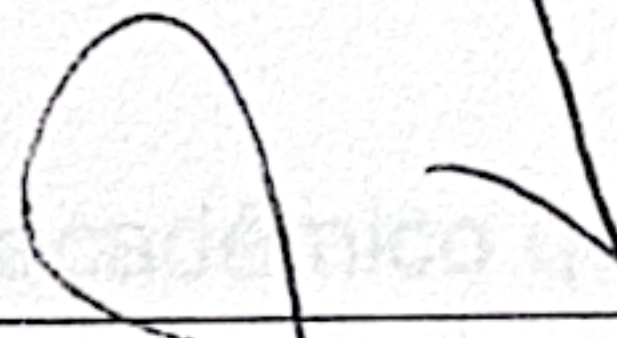
Ph.D. Pedro Arturo Martínez Hernández

ASESOR:



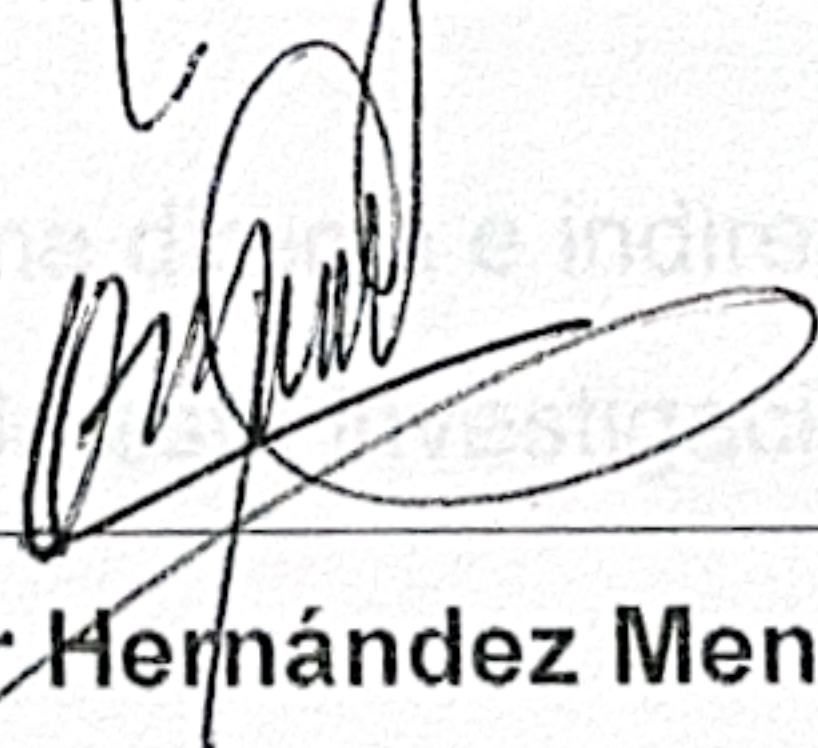
Dra. Edna María Álvarez Sánchez

ASESOR:



Dr. Luís Alberto Miranda Romero

ASESOR:



Ph.D. Omar Hernández Mendo

GRACIAS POR TODO SU APOYO

A.T 3469

DEDICATORIA

A Dios nuestro señor, por permitirme existir.

A mi esposa Karina Pérez Robles, por que siempre estás conmigo,
apoyándome en todo momento, con todo mi amor.

A mis padres Ángel Moreno Vega y Felipa Carrillo Espinosa, como una muestra
de agradecimiento y amor por todo lo que he recibido de ustedes.

A mis hermanos Diego, Samuel, Ricardo, que en todo momento me han
apoyado y son mis mejores amigos.

A mis suegros Nahum Pérez Carlos y Yolanda Robles Aragón por su apoyo y
cariño.

A mis cuñadas, cuñados, sobrinas, sobrinos, primas y primos, por su amistad
incondicional.

A mis amigos y compañeros de la Universidad.

Al personal técnico, administrativo y académico que colaboró con su trabajo y
dedicación.

A todas aquellas personas que en forma directa e indirecta compartieron
conmigo la experiencia de esta investigación.

GRACIAS POR TODO SU APOYO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de lograr una meta más en mi vida profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme una beca para la realización de mis estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por el apoyo de beca-tesis.

Al Departamento de Zootecnia y al Posgrado en Producción Animal, por el apoyo durante mi estancia para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Posgraduados por permitir la realización de la fase experimental en sus instalaciones.

Al Departamento de Suelos por facilitar su laboratorio de fertilidad.

Al Ph.D. Pedro Arturo Martínez Hernández por su valiosa participación en el desarrollo de la investigación, por sus consejos, por el conocimiento que me transmitió para mi formación académica y por su amistad.

A la Dra. Edna María Álvarez Sánchez por su importante colaboración en la fase de laboratorio y por las observaciones para mejorar el trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por sus enseñanzas y colaboración en la fase de laboratorio.

Al Ph.D. Omar Hernández Mendo por el apoyo en la fase experimental, y por las sugerencias para lograr esta investigación.

A los profesores del Posgrado en Producción Animal por sus importantes aportes académicos, especialmente al Ph.D. Rafael Núñez Domínguez, por su acertada sugerencia para mejorar la calidad de esta investigación.

GRACIAS

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor realizó sus estudios en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Departamento de Zootecnia obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Zootecnia con la tesis titulada “Efecto de la fitohormona esteroidal cidef-4 en el rendimiento y calidad de semilla del pasto guinea”. Cuenta con el artículo científico publicado en la Revista Técnica Pecuaria que pertenece al Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del Conacyt en el año 2006 (Téc Pecu Méx 44(2): 193-201). En experiencia laboral, académica y de investigación agropecuaria, ha laborado en diferentes proyectos de producción ganadera y desarrollo rural; ha sido asesor agropecuario, responsable del laboratorio de conservación de materias primas almacenadas, coordinador de almacén, consultor, encuestador y evaluador del programa de alianza para el campo. Tiene una acreditación para la prestación del servicio profesional en diseño de proyectos de desarrollo. Participante y ponente en congresos, cursos, talleres entre otras actividades.

miguelmorero79@yahoo.com.mx. Correspondencia al autor.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo	2
1.2. Hipótesis	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. La fijación simbiótica del nitrógeno por leguminosas forrajeras	3
2.2. Dinámica del nitrógeno en una pradera con cosecha por pastoreo	7
2.3. Comparación de los aportes industrial y biológico de nitrógeno al sistema pradera	11
2.4. El trébol blanco	14
2.5. La asociación gramínea-trébol blanco	18
2.5.1. Proporciones de gramínea y trébol blanco al establecimiento	21
2.5.2. Competencia de la gramínea con el trébol blanco	22
2.5.3. Efecto del pastoreo sobre la asociación gramínea-trébol blanco	23
2.6. La asociación ovillo-trébol blanco	24
2.7. Transferencia de nitrógeno de leguminosas a gramíneas	25

	Página
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Localización del experimento y período experimental	27
3.2. Tratamientos y diseño experimental	27
3.3. Prácticas culturales	28
3.4. Pastoreos experimentales	30
3.5. Variables medidas y calculadas	31
3.6. Manejo y análisis estadístico de datos	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Fertilidad del suelo	39
4.2. Perfil microbiológico de la fase suelo-planta	39
4.3. Contenido de nitrógeno en suelo	44
4.4. Atributos del ovillo	46
4.5. Características de la pradera en el cuarto pastoreo	56
4.6. Contenido de nitrógeno en heces	59
4.7. Contenido de nitrógeno en orina	62
5. CONCLUSIONES	65
6. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Rendimiento de forraje de trébol blanco en diferentes condiciones en México y otros países	17
Cuadro 2. Rendimiento de forraje en praderas asociadas con trébol blanco en diferentes condiciones	20
Cuadro 3. Contenidos de nitrógeno orgánico e inorgánico (mg N kg^{-1} suelo) en suelo donde creció ovinillo en tres tipos de pradera y cosechado por pastoreo	45
Cuadro 4. Forraje ofrecido y residual, de ovinillo y otros componentes (kg ha^{-1}) en tres tipos de praderas y tres pastoreos	47
Cuadro 5. Concentración (%) de nitrógeno en la masa de forraje ofrecido y residual de ovinillo crecido en tres tipos de pradera y cosechado por pastoreo	51
Cuadro 6. Cantidad de nitrógeno (kg N ha^{-1}) en la mas de forraje ofrecido de ovinillo crecido en tres tipos de pradera y cosechado por pastoreo	53
Cuadro 7. Atributos (kg N ha^{-1}) de tres tipos de pradera en el cuarto y último pastoreo experimental	56
Cuadro 8. Concentración de nitrógeno (%), cantidad ($\text{g MS borregos}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y cantidad de nitrógeno excretado (g borrego^{-1}) en heces de borregos pastoreado tres tipos de praderas	60

Cuadro 9. Concentración de nitrógeno (%), cantidad ($\text{ml borrego}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y cantidad de nitrógeno excretado ($\text{g borrego}^{-1} \text{ día}^{-1}$) en la orina de borregos pastoreando tres tipos de praderas

63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Actividad respiratoria en suelos con diferente vegetación	40
Figura 2. Colonización por micorrizas en raíces de ovinillo y trébol blanco crecidos solos y asociados	41
Figura 3. Colonización por estructuras de micorrizas (hifas, vesículas y arbuscúlos) en raíces de ovinillo y trébol blanco crecidos solos y asociados	41
Figura 4. Potencial de colonización por hongos endomicorrízicos en suelo con dos tipos de pradera	42
Figura 5. Cantidad de nódulos en raíces de trébol blanco crecido en asociación con ovinillo o monófito en banco de proteína	43
Figura 6. Cantidad total de forraje ofrecido de ovinillo crecido en tres tipos de pradera, sumatoria de tres pastoreos	49
Figura 7. Concentración de nitrógeno en raíces de ovinillo crecido en tres tipos de pradera al final del cuarto pastoreo	55

RESUMEN

TRANSFERENCIA DE NITRÓGENO DEL TRÉBOL BLANCO AL OVILLO MEDIANTE PASTOREO

Miguel Ángel Moreno Carrillo

(Bajo la dirección de Pedro Arturo Martínez Hernández)

El objetivo fue determinar en campo, la importancia relativa de la transferencia del N fijado por el trébol blanco (*Trifolium repens* L.) al ovillo (*Dactylis glomerata* L.), vía el pastoreo por borregos. Los tratamientos fueron cultivar ovillo en tres tipos de pradera: monófito, asociada y con banco de proteína. El diseño fue completamente al azar con tres repeticiones. La densidad de siembra fue de 2292 semillas germinables m². Con cuatro pastoreos experimentales. La pradera con los mejores resultados agronómicos fue la de ovillo asociado con trébol blanco este mejor comportamiento evidenció que la transferencia directa del nitrógeno fijado de una a la otra especie fue mayor; mientras que el animal pastoreador aún cuando es una vía de transferencia indirecta requiere de mayor tiempo para mostrar efecto en los atributos agronómicos. Por tanto, en lo posible se propone como una mejor alternativa para una rápida transferencia de nitrógeno el crecer ovillo y trébol blanco en asociación.

Palabras clave: transferencia, nitrógeno, fijación, borrego, forraje, pradera

ABSTRACT

NITROGEN TRANSFER FROM WHITE CLOVER TO ORCHARDGRASS BY GRAZING

M. A. Moreno

(Under the supervision of P.A. Martínez)

The objective was to determine in the field, the relative importance of the transfer of N fixed by the white clover (*Trifolium repens* L.) to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), by grazing sheep. Treatments were orchardgrass grown in pure stand, in association, and with a protein bank. Experimental design was completely random with three replications. Seed density was 2292 seeds per m². A total of four grazing periods were done. Orchardgrass grown in association with white clover was the pasture with the best agronomic attributes, the better agronomic performance of this pasture is indicative that direct N transfer was high; even though sheep were a means of N transfer, it takes longer to influence in agronomic attributes of orchardgrass. Thus, for N transfer in a short time, it is better to grow orchardgrass in association with white clover.

Key words: N transfer, N fixation, sheep, pasture, forages.

1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es un elemento fundamental para que las praderas alcancen sus mayores rendimientos de forraje y con ello pueda favorecerse una mayor rentabilidad de la empresa ganadera.

El aporte de nitrógeno al sistema pradera puede ser por vía industrial o biológica; dentro de la biológica la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico al suelo ha sido indicada como una alternativa de mayor factibilidad ecológica por su bajo impacto ambiental, además de ser una alternativa de bajo costo. Las plantas leguminosas pueden desarrollar la fijación de nitrógeno atmosférico al entrar en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Por lo que en praderas, incluir leguminosas forrajeras en asociación con algunas gramíneas, es una forma de incorporar y usar nitrógeno en el sistema pradera con bajo impacto ambiental y costo.

Identificar las vías y cantidades relativas de transferencia del N fijado por la leguminosa a otros componentes del sistema pradera, permite lograr una comprensión mejor de los factores que determinan dicha transferencia, así como en la toma de decisiones para un uso máximo posible del N fijado por la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*.

El pastoreo es una de las formas más extendidas de aprovechamiento de las praderas, por lo que, es de interés si esta forma de aprovechamiento representa una vía importante en la transferencia del N fijado por la simbiosis al resto del sistema pradera.

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y ovillo (*Dactylis glomerata* L.) son dos especies forrajeras de uso común en diferentes regiones templadas en México y otros lugares del mundo, por lo anterior, es importante describir la dinámica de transferencia del N fijado por el trébol al pasto ovillo.

1.1. Objetivo

El objetivo de esta investigación fue determinar en campo, la importancia relativa de la transferencia del N fijado por el trébol blanco (*Trifolium repens* L.) al ovillo (*Dactylis glomerata* L.), vía el pastoreo por borregos.

1.2. Hipótesis

El pastoreo es una forma de aprovechamiento del forraje que incrementa la transferencia de nitrógeno del trébol blanco al ovillo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La fijación simbiótica del nitrógeno por leguminosas forrajeras

El aire está conformado en 78% por nitrógeno molecular (N_2), la incorporación de este nitrógeno elemental a sistemas biológicos puede ser realizada únicamente por algunas bacterias. Algunos organismos superiores como las plantas leguminosas pueden hacerse del N_2 mediante una asociación simbiótica con bacterias que fijan este N en compuestos orgánicos (Broughton, 1981). Las bacterias fijadoras de N pueden incorporar anualmente hasta 150 millones de toneladas de N (Brill, 1977). Los géneros de bacterias que pueden establecer simbiosis con plantas leguminosas son *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Coyne, 2000).

La cantidad de nitrógeno fijado por la simbiosis de estas bacterias con plantas leguminosas varía ampliamente, Coyne (2000) encontró valores de 600, 125 a 335 y de 85 a 190 kg de N fijado $ha^{-1} año^{-1}$ en leguminosas forrajeras tropicales, alfalfa y tréboles, respectivamente. Beuselinck *et al.*, (1994) obtuvieron en promedio 270 kg de N fijado $ha^{-1} año^{-1}$, y que las leguminosas para grano fijaron menos nitrógeno que las forrajeras, ya que las primeras eran de un ciclo de crecimiento más corto y con menor masa radical para la formación de nódulos que las forrajeras.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* son de vida libre, Gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas facultativas, móviles y quimioheterótrofas. Subsisten en el suelo como heterótrofos saprófitos cuando no están infectando a su huésped. Del género *Azorhizobium* se conoce una sola especie (*A. caulinodans*) en simbiosis con sesbania (*Sesbania rostrata*); de *Bradyrhizobium* se conocen dos especies (*B. elkanii* y *B. japonicum*) específicas de la soya (*Glicine soja*); del *Rhizobium* se conocen ocho especies y cuatro variedades con huésped específico, de las que destacan las de leguminosas forrajeras como: alfalfa (*R. meliloti*), trébol (*R. trifolii*) y leucaena (*R. tropici*) (Coyne, 2000).

Marín (1997) compendió información estableciendo que en los suelos de México existen cepas nativas de *Rhizobium*, pero a menudo fallan en producir una nodulación efectiva, ya sea por su escaso número o porque no pueden establecer una simbiosis efectiva con la leguminosa. Por lo anterior, la inoculación de la semilla con *Rhizobium* específico debe considerarse como una práctica agronómica rutinaria, cuando se establecen leguminosas en un terreno donde no se tienen antecedentes de la siembra reciente con leguminosas. Dutto *et al.* (1999) confirmaron la necesidad de inocular la semilla con la bacteria específica, cuando no se tiene la seguridad de una alta población en el suelo, encontrando que la población de bacterias fijadoras en semilla podía incrementarse en 100 veces al inocularse, en comparación a la no inoculación en ambientes con pobre población inicial de este tipo de bacterias.

Dependiendo de la estación, el historial de cultivo y las prácticas de tratamiento agrícola, pueden existir entre 10 y 10^6 *Rhizobium* por gramo de suelo. Si se ha cultivado en algún momento leguminosas, lo más probable es que el número de *Rhizobium* sea elevado (Whitehead, 1995). Dutto *et al.* (1999) indican que una población de 2200 bacterias de *Rhizobium* g^{-1} de suelo en forma natural, es aceptable para el establecimiento de la simbiosis con trébol blanco.

El primer paso en la relación simbiótica es la formación de nódulos, cuando los Rhizobia del suelo reconocen la presencia del huésped adecuado, la planta libera compuestos llamados flavones; que atraen, estimulan o envían señales a cepas específicas de Rhizobia (Coyne, 2000). Estos flavones contienen aminoácidos que rápidamente son convertidos por el *Rhizobium* en la hormona vegetal ácido indol-acético, que tiene un papel importante en el proceso de infección, ya que estimula la formación y elongación de los pelos radicales que se enroscan y forman una estructura llamada “cayado” (Broughton, 1981). Los Rhizobia penetran en la raíz de la leguminosa a través de un pelo radical, éste se invagina y constituye un tubo de infección que contiene un enjambre de células de Rhizobia proliferante, de las cuales muchas abortan, pero algunas avanzan hacia la base del pelo radical (Brill, 1977).

Las condiciones demandadas por el *Rhizobium* para la fijación del N_2 son cubiertas por la leguminosa, ya que suministra carbono y regula el oxígeno (Broughton, 1981). El oxígeno es atrapado antes de que alcance a las bacterias por una proteína que se enlaza con él, la leg-hemoglobina, que se sintetiza en

el tejido vegetal de los nódulos radicales. A consecuencia de esto, el *Rhizobium* puede adoptar un metabolismo aeróbico eficaz, mientras protege a la nitrogenasa del oxígeno (Brill, 1977). Coyne (2000) menciona que la leg-hemoglobina se acumula entre los Rhizobia y la membrana peribacteroide donde captura eficazmente el oxígeno, brindando un ambiente que contiene menos de 20% de oxígeno (micro ambiente) que permite mayor fijación de N_2 .

Para la fijación del N_2 atmosférico, el *Rhizobium* cuenta con el sistema enzimático nitrogenasa, el cual requiere de condiciones anaeróbicas para funcionar, ya que es una enzima óxido-lábil (Brill, 1977). El sistema enzimático nitrogenasa producido por el *Rhizobium* consiste de dos enzimas, una con peso molecular de 220 000 y la otra de 55 000. La enzima más pesada contiene Fe y Mo y es la encargada de la fijación de N_2 ; la enzima más liviana también contiene Fe y provee de los electrones necesarios para el proceso de fijación. Para romper el triple enlace de la molécula de N_2 , se invierte gran cantidad de energía que es provista por ATP's de la respiración de la mitocondria bacterial, en trébol rojo, por ejemplo, el costo respiratorio por la fijación de N_2 fue de 4 mg C por mg N_2 fijado (Whitehead, 1995).

El producto de la reacción de fijación de N_2 , por el sistema enzimático nitrogenasa, es amonio (NH_3) que es liberado fuera del nódulo en forma de ion hacia el citoplasma de la célula infectada, donde es asimilado vía Glutamato-Sintetasa y utilizado en la síntesis de N orgánico para su transporte (Date, 1991). El amoniaco se transforma en asparagina y glutamina en leguminosas

de zonas templadas, y en alantoína y ácido alantoico en leguminosas tropicales (Coyne, 2000). En el trébol blanco hay una transferencia de N de glutamina a asparagina, este último aminoácido es transportado por el xilema (Whitehead, 1995).

Coyne (2000) menciona que son necesarios 22 moles de glucosa por un mol de nitrógeno fijado, por lo que la leguminosa destina 7 a 12% de la producción fotosintética a los nódulos. A pesar de este gasto de energía, no hay evidencia directa de que la fijación de N_2 restrinja el crecimiento de la leguminosa (Whitehead, 1995).

La fijación simbiótica de N_2 esta íntimamente ligada a la fotosíntesis de la leguminosa, por tanto, la defoliación de la leguminosa ocasiona desvío de energía y nutrientes metabólicos hacia la zona de rebrote, a expensas de la planta madre. Por consecuencia, reduce el peso de la raíz, afectando la absorción de agua y nutrientes del suelo. La fijación biológica de N_2 se reduce, siendo cercana a cero cuando la defoliación fue muy severa y permanece baja por más de dos semanas, hasta que se recupera lentamente (Beuselinck *et al.*, 1994).

2.2. Dinámica del nitrógeno en una pradera con cosecha por pastoreo

A partir de un estudio de 5 años de duración, McIlroy (1984) señala la importancia de las leguminosas y su aporte de N al sistema pradera en el

mantenimiento del rendimiento de forraje, las gramíneas sin presencia de leguminosa rindieron 30% menos forraje que las gramíneas con presencia de leguminosas.

En una pradera asociada gramínea-leguminosa, se espera que parte del nitrógeno fijado por la leguminosa sea transferido a la gramínea. Para que esto suceda, el nitrógeno presente en los tejidos de la leguminosa debe pasar a la solución del suelo a través de la descomposición de dichos tejidos, y el nitrógeno en la solución del suelo podrá ser absorbido por la gramínea (Whitehead, 1995). La transferencia de nitrógeno de la leguminosa al sistema pradera puede ser mínima en los primeros meses después de la siembra, ya que la leguminosa incorpora a sus tejidos nuevos el N fijado y la cantidad de material muerto es poca.

Hogh-Jensen y Schjoerring (1997) encontraron que sólo 3% del N fijado por trébol blanco fue transferido a la gramínea en el primer año, y llegó a 22% en el tercer año. La transferencia de N se incrementa después del primer año de establecimiento y puede seguir aumentando progresivamente hasta los 4 ó 5 años luego de la siembra de la leguminosa (Mallarino *et al.*, 1990).

Whitehead (1995) indica que el trébol blanco transfirió de 0 a 75% del nitrógeno fijado a la gramínea acompañante, conforme el tiempo transcurrido después de la siembra fue mayor, y que la proporción del N fijado por la leguminosa que es recuperada en la gramínea acompañante es mayor conforme la proporción de

gramínea es menor a la de la leguminosa en la asociación. La mayor proporción de N recuperado en la gramínea, promueve a su vez un mayor crecimiento de la gramínea aun cuando la pradera pueda estar inicialmente dominada por la leguminosa (Whitehead, 1995).

El N transferido por el trébol al sistema pradera puede proporcionar hasta 80% del N total presente en la gramínea (Boller y Nosberger, 1987). Ledgard (1991) encontró que las concentraciones de N en el componente gramínea de una asociación gramínea-trébol blanco fueron de 15 a 50% mayores a las encontradas en la gramínea cuando está creció en cultivo monoespecífico, y estimó que la transferencia de N del trébol blanco a la gramínea fue de 70 kg N ha⁻¹ año⁻¹. Esta transferencia es mayor a la reportada por Boller y Nosberger (1987), donde obtuvieron 52 kg N ha⁻¹ año⁻¹.

La cantidad de N que la leguminosa forrajera pudiera transferir al sistema pradera está influida por la severidad y frecuencia de cosecha a la que se someta la leguminosa, presencia de animales pastoreando y factores del ambiente físico, como la intensidad de la luz, factores que determinan fotosíntesis y puntos de consumo que competirán con la alimentación del proceso de fijación de nitrógeno por los fotosintatos elaborados (Curl y Wilkins, 1982). Whitehead (1995) menciona que durante la primavera algunas leguminosas como el trébol blanco muestran una mayor transferencia al sistema pradera del N fijado, debido a la degradación del material vegetal muerto acumulado durante el invierno previo. Ledgard (1991) encontró fuerte

variación estacional en la transferencia del nitrógeno de la leguminosa a la gramínea asociada, en verano trébol blanco transfirió a la gramínea 4.1 kg N ha⁻¹, mientras que en otoño solo transfirió 14% de esta cantidad.

Cuando una pradera es pastoreada, mucho del N en el forraje consumido por el animal retorna al sistema pradera en las deyecciones y parte de ese N es posteriormente absorbido por la gramínea (Whitehead, 1995). Ledgard (1991) demostró la importancia del efecto animal vía las deyecciones para mantener el rendimiento de forraje de praderas de gramíneas, cuando una pradera de gramínea fue cosechada mecánicamente (sin presencia de animales) mostró un rendimiento anual 44% menor al de la misma gramínea cosechada por pastoreo. Además, mostró que el impacto positivo de la incorporación de nitrógeno al sistema pradera mediante la leguminosa se suma al de las deyecciones de los animales, la gramínea en asociación con el trébol blanco y cosecha por pastoreo mostró un rendimiento anual 26% superior al de la gramínea sola en cosecha por pastoreo. Este autor estimó que el trébol blanco transfirió a la gramínea, a través de los animales pastoreadores, 60 kg N ha⁻¹ año⁻¹.

El 80% o más del nitrógeno que retorna el rumiante en pastoreo lo hace mediante la orina (Whitehead, 1995); esta vía de retorno puede ser poco eficiente para hacer llegar a la planta forrajera el nitrógeno retornado, esto debido a que la orina cae en una superficie muy reducida, lo que ocasiona una concentración muy alta de nitrógeno en forma muy lábil y las plantas cercanas a

la superficie contaminada con la orina no pueden absorber con rapidez este nitrógeno, por lo que queda sujeto a procesos de volatilización y lixiviación (Ledgard, 1991).

2.3. Comparación de los aportes industrial y biológico de nitrógeno al sistema pradera

El nitrógeno industrial es fijado por procesos físicos controlados por el humano y se comercializa en fertilizantes químicos. Entre los fertilizantes químicos nitrogenados están (FIRA, 1986): sulfato de amonio (20.5% N); nitrato de amonio (33.9% N); nitrato chileno (16% N); urea (42 a 45% N); y, amoníaco anhidro (82% N). Esta misma fuente indica que los fertilizantes más comunes en México son urea, sulfato y nitrato de amonio. El nitrógeno biológico es el provisto por la fijación de nitrógeno realizada por las leguminosas. Comúnmente la aplicación de fertilizante nitrogenado a una pradera de gramínea ocasiona una respuesta en menor tiempo que el aporte de nitrógeno por fijación de la leguminosa, esto se ha explicado por la mayor capacidad de las plantas en absorber nitrógeno en iones inorgánicos (NH_4^+ y NO_3^-) que en compuestos orgánicos. Por lo que el nitrógeno fijado por la leguminosa que está en compuestos orgánicos debe ser mineralizado a iones inorgánicos para que sea absorbido por la gramínea (Engels y Marschner, 1995; Ledgard y Giller, 1995).

La rapidez en absorción del nitrógeno a partir de fertilizantes nitrogenados, si bien, origina una respuesta en menor tiempo que el aportado biológicamente puede presentar también un mayor riesgo ambiental y menor eficiencia.

La fertilización con N promueve una mayor masa de forraje, debido a que el N absorbido se destina a la formación de compuestos nitrogenados necesarios para la formación y crecimiento de hojas (Marschner, 1997). Soto *et al.* (1980) en kikuyo, encontraron que al incrementar la fertilización nitrogenada de 0 a 100 kg N ha⁻¹ año⁻¹, el rendimiento de forraje aumentó de 1.43 a 2.86 t MS ha⁻¹, y el consumo voluntario de 52.3 a 70.6 g kg PV^{-0.75} día⁻¹; los autores explicaron el incremento en consumo, como una consecuencia de que la fertilización nitrogenada aumentó tanto la disponibilidad de forraje, como la proporción de hoja en el forraje producido.

Praderas asociadas de gramínea-leguminosa tienen rendimientos mayores que praderas de gramíneas fertilizadas con 100 kg de N ha⁻¹ (Whitehead, 1995). Beuselinck *et al.* (1994) revisaron el resultado de 24 experimentos, concluyendo que al incorporar una leguminosa al dosel de gramínea se incrementaba la ganancia de peso en 0.145 y 0.151 kg día⁻¹ para novillos y vaquillas, respectivamente, en comparación a la gramínea con fertilización nitrogenada.

Dorantes (1997) obtuvo mayor contenido de proteína en la asociación avena-ballico anual con fertilización nitrogenada que en mezcla de esta asociación con leguminosas. Este autor refiere que el aumento en la concentración de proteína cruda encontrada en las gramíneas también ha sido reportado por otros autores, pero la fertilización nitrogenada no mostró una tendencia definida, lo cual también coincide con otros estudios, concluyendo que el efecto de la fertilización nitrogenada en gramíneas de clima templado puede ser positivo,

nulo o negativo. Si el contenido de proteína en la gramínea es inferior a 8%, la fertilización nitrogenada permitirá mejoras importantes en la digestibilidad. Sin embargo, si el contenido de los otros nutrientes es bajo, como fósforo, potasio, calcio y magnesio, la fertilización nitrogenada provocará depresiones de la concentración de éstos, afectando la respuesta en valor nutritivo (Durán, 1994).

La fertilización nitrogenada puede elevar la concentración de proteína cruda en las gramíneas, pero a costa de reducir la concentración de carbohidratos no estructurales. En ballico perenne, la fertilización con N aumentó el contenido de N total en 2%, pero a costa de la disminución de 1% en carbohidratos solubles y aumento del 4% de la celulosa (Marschner, 1997). Esto implica una mayor competencia por fotosintatos entre varias vías metabólicas, como la formación de fitohormonas, amidas y aminoácidos.

Proveniente de un estudio de nueve años de duración, Sapek (1997) encontró que la capacidad de algunas gramíneas de absorber el N aplicado como nitrato de amonio al suelo, puede ser superada y con ello el N no absorbido queda sujeto a lixiviación, reduciendo con ello la eficiencia de uso del N y aumentando el riesgo de contaminación. En particular, a dosis mayores de $120 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ encontró que este problema se incrementaba y que aún con esta dosis de N, solamente se alcanzó a recuperar 10% del N en el forraje cosechado.

Deinum y Sibma (1980) mencionan que con gramíneas templadas, a partir de dosis de $400 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ se aumenta el riesgo de impacto ambiental

negativo, por presentarse niveles de lixiviación de N de alto riesgo ambiental; y la severidad y frecuencia de defoliación pueden amortiguar o incrementar este riesgo de contaminación ambiental por lixiviación del N aplicado en forma de fertilizante.

Carambula (1977) indica que el aporte del componente leguminosa en una asociación gramínea-leguminosa es muy sensible a la aplicación de N inorgánico, ya que a medida que incrementó la fertilización nitrogenada, la leguminosa disminuyó su aporte al rendimiento de la asociación; por el contrario la gramínea mostró un comportamiento lineal ascendente, ya que conforme incrementó la fertilización nitrogenada la gramínea aumentó su aporte al rendimiento total.

2.4. El trébol blanco

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es nativo de Europa, de los países del este del Mediterráneo o del oeste de Asia Menor. Se tiene registrada su producción en Inglaterra desde 1707 (Hughes *et al.*, 1981).

El trébol blanco en Inglaterra es un componente normal e importante de las pasturas en los suelos más fértiles desde las épocas medievales. Aunque estaba incluido en las mezclas de pasturas sembradas desde hace más de 50 años, fue a principios del siglo XX cuando se comprobó su valor esencial en las pasturas (Cooper y Morris, 1986).

Baker y Williams (1989) citan que las variedades de trébol blanco caen dentro de las categorías de “agresivos” (ladino) y “no agresivos” (S 100, Virginia y Lousiana), pero no caen en la categoría de “muy agresivos” como el trébol rojo. También encontraron que el trébol blanco Ladino y Virginia tenían mayor crecimiento en otoño que en primavera.

El trébol blanco debe sembrarse en la estación lluviosa, ya que se obtiene mejor rendimiento. Cuando se va a sembrar trébol blanco por primera vez es conveniente inocular la semilla. El trébol blanco puede sembrarse como pradera monoespecífica, pero para reducir el riesgo de timpanismo es siempre recomendable sembrarlo en asociación con una o varias gramíneas, además el componente gramínea puede hacer uso del N incorporado al sistema pradera por parte del trébol blanco (Flores, 1994).

Carambula (1977) indica que el trébol blanco prospera en zonas con temperaturas moderadas en el verano y humedad del suelo alta, y que sequías prolongadas pueden ocasionar la muerte en un gran número de individuos. Langer (1981) no recomienda sembrar trébol blanco si la precipitación anual no supera los 630 mm, y que vientos secos en primavera y verano pueden disminuir el potencial de rendimiento y sobrevivencia del trébol blanco.

Las producciones estacionales del trébol blanco varían en cada área geográfica, en función de la temperatura y condiciones de humedad (Muslera y Ratera, 1991). Por ser una especie estolonífera, solamente la biomasa de

crecimiento vertical (hojas y pedúnculos) es la susceptible a ser cosechada, quedando los meristemos apicales resguardados de ser cosechados (Carambula, 1977).

El trébol blanco llegó a México desde Estados Unidos y se adaptó bien en los Valles de México, de Toluca y del Bajío (Flores, 1994). El trébol blanco crece en suelos desde arcillosos y limosos, hasta arenosos, en las regiones húmedas, cuando se aplican fertilizantes minerales y cal (Hollowell, 1984). Prefiere suelos neutros, ligeramente ácidos, con pH de 6.0 a 7.0 (Ramírez, 1973), soporta suelos muy pobres si son húmedos y con suficiente fósforo (Carambula, 1977). El trébol blanco puede producirse asociado con gramíneas, como festuca alta, ovinillo y raigras (Jiménez, 1983) y frecuentemente con otras leguminosas (Jiménez y Avendaño, 1988).

Ramírez (1973) recomienda que se debe preparar bien la cama donde se sembrará, y con mejor época de siembra el otoño en tierras de riego o de buen temporal; si se siembra solo propone que sea a razón de 5 kg de SPV ha⁻¹ y si es en asociación con otras gramíneas o leguminosas 3 kg SPV ha⁻¹, inoculando la semilla preferentemente y colocándola a una profundidad de 1 cm.

La fertilización debe efectuarse poco antes o durante la siembra. No requiere una fertilización nitrogenada debido a los nódulos de las bacterias de sus raíces, requiriendo mayormente fósforo y potasio, aunque en forma moderada el primero para no disminuir la cantidad de magnesio en el forraje, y anualmente

de 300 a 600 kg de superfosfato y de 100 a 200 kg de potasio (Juscafresa, 1983). El rendimiento del trébol blanco varía según las condiciones ambientales en que se cultive, puede ir de 3.9 a 24 t ha⁻¹ año⁻¹, en Nueva Zelanda; mientras que en Colombia va de 1 t en cuatro meses a 12 t ha⁻¹ año⁻¹. En México el intervalo de rendimiento no es tan amplio como lo encontrado en los dos países anteriores, y va de 8 a 16 t ha⁻¹ año⁻¹ (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimiento de forraje de trébol blanco en diferentes condiciones en México y otros países.

Lugar y condiciones	Rendimiento Kg de MS ha ⁻¹ año ⁻¹
NUEVA ZELANDA	
Clima templado	4000 a 14000
Siembras no irrigadas	3900 a 8650
Corte y baja precipitación	5000 a 5800
Riego y corte mensual	8700
630 mm de precipitación	4500 a 5600
Siembra pura	10000
COLOMBIA	
Cuatro meses	1000
Buenas condiciones de clima y Suelo	10000 a 12000
ESPAÑA	
Corte	9000 a 12000
MÉXICO	
Riego y corte	8030 a 9050
Riego y corte	9420 a 10550
6 a 10 cortes	12000 a 16000

Fuente: Tomado de Román y Zúñiga (1996)

Román y Zúñiga (1996) concluyen a partir de varios estudios consultados, que en México la moda de rendimiento es de $9 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. El menor intervalo de rendimiento en México es reflejo de la adaptación del trébol blanco a las condiciones climáticas y agronómicas locales.

Por el crecimiento estolonífero del trébol blanco, lo cosechado o consumido está conformado principalmente por hojas lo que implica un alto valor nutritivo (Hollowell, 1984). Langer (1981) señala que el forraje de trébol blanco es de buen aporte nutrimental al presentar 19.4, 9.8 y 20.7% de proteína, minerales y fibra cruda, respectivamente. FIRA (1986) también señala que el forraje de trébol blanco es de buena calidad al contener $2.67 \text{ Mcal kg}^{-1}$ y una digestibilidad de 70% o mayor.

2.5. La asociación gramínea-trébol blanco

El objetivo principal del trébol blanco es utilizarse bajo pastoreo y por ello se siembra con gramíneas asociadas y a veces también con otras leguminosas (Langer, 1981). De acuerdo con Muslera y Ratera (1991), cuando se siembra trébol blanco en asociación con raigras perenne, su contribución a la mezcla raramente supera del 25 al 35% de la producción total de materia seca de la pradera. McIlroy (1984) encontró que las gramíneas en las praderas sin fertilizantes ni trébol contenían 2.31% de nitrógeno, mientras que las asociadas con trébol contenían 3.49% de nitrógeno. En las praderas de gramíneas con tréboles, el trébol blanco fijaba $560 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, aproximadamente.

El rendimiento máximo de trébol blanco se da alrededor del otoño, en asociación crece mejor cuando la gramínea crece menos; en cambio si se siembra puro su tasa máxima de crecimiento es a mediados de verano, ya que está relacionado con la máxima temperatura diurna (Langer, 1981).

El rendimiento del trébol blanco es variable según las condiciones ambientales, de una revisión de informes sobre el rendimiento de forraje de trébol blanco (Cuadro 2), se encontró que este puede ir desde 2.8 a 19.2 t MS ha⁻¹ año⁻¹. En general la tendencia fue a encontrar rendimientos más altos cuando la cosecha se realizó por pastoreo en comparación a la cosecha por corte mecánico. Posiblemente la tendencia a un mayor rendimiento con el pastoreo se debe al efecto positivo de las deyecciones de los animales que retornan minerales no absorbidos por los animales e incrementan el contenido de materia orgánica del suelo, dando una mejor estructura física al mismo.

Marín (1997) encontró variaciones en el rendimiento de forraje entre las diferentes variedades de trébol blanco, siendo la var. Ladino la que mostró el mayor rendimiento. Esto fue explicado en base a que Ladino es una variedad de porte grande, seleccionada por rendimiento y con alta producción en primavera-verano.

Whitehead (1995) con base en estudios revisados, indica que la cantidad de N que puede fijar trébol blanco en una pradera asociada puede ser influida por la frecuencia de cosecha. En la asociación raigras-trébol blanco, la cantidad de N

fijado por el trébol equivalió a 168 kg de N ha⁻¹ con tres cosechas por año, pero fue de 202 y 275 kg ha⁻¹ cuando se cortó de seis a ocho veces ó 2 veces por semana, respectivamente.

Cuadro 2. Rendimiento de forraje en praderas asociadas con trébol blanco en diferentes condiciones.

Condiciones	Rendimiento t de MS ha ⁻¹ año ⁻¹	Referencia
Pastoreo		
Asociado con festuca	12.9	García y Juárez (1994)
Asociado con raigras	13.6	
Asociado con lotus-ovillo	15.3	
Asociado con lotus-festuca	15.2	
Asociado con lotus-ovillo	14.9	
Corte		
Asociado con raigras perenne	10.8-19.2	Marín (1997)
Asociado con raigras perenne	8.8-10.9	Frame y Paterson (1987)
Asociado con raigras	8.5	Tahtacioglu <i>et al.</i> (1999)
Asociado con bromas	9.6	
Asociado con raigras-ovillo	8.6	Jiménez (1983)
Asociado con raigras-bromus	8.6	
Asociado con bromus-ovillo	9.1	
Asociado con raigras	11.9	
Asociado con raigras italiano	11.7	
Asociado con festuca	12.5	Swift <i>et al.</i> (1992)
Asociado con raigras	9.7	
Asociado con raigras	2.8 a 5.6	Langer (1981)
(Rendimiento del trébol)		
Asociado en riego y fertilizado	24.0	Muslera y Ratera (1991)
Asociado con festuca u oville (70 % trébol)	10.0 a 15.0	
Asociado con otras (50 % trébol)	12.0 a 17.0	
Asociado con festuca	14.1	Badoux (1993)
Asociado con festuca-ovillo	13.0	
Asociado con festuca-ovillo-Raigras	14.5	

2.5.1 Proporciones de gramínea y trébol blanco al establecimiento

Carambula (1997) menciona que el porcentaje de leguminosa determina la concentración de proteína en el forraje cosechado de una pradera asociada, por lo que recomienda que el forraje de una pradera asociada deba conformarse con al menos 30% de leguminosa, para proporcionar un forraje con alta concentración de proteína.

Baker y Williams (1989) encontraron que al variar la densidad de siembra del raigras perenne de 0 a 67 kg SPV ha⁻¹ y manteniendo constante las densidades de los tréboles rojo y blanco a 4.5 y 3.4 kg SPV ha⁻¹, respectivamente, en los primeros seis meses, luego de la siembra, el aporte de los tréboles al rendimiento total descendió linealmente conforme la densidad de siembra del raigras aumentó, en particular el trébol blanco redujo su aporte en 73% al pasar la densidad de siembra del raigras de 0 a 67 kg SPV ha⁻¹. Cuando la densidad de siembra del raigras se mantuvo constante y la del trébol blanco se aumentó de 1.1 a 3.3 kg de SPV ha⁻¹ el aporte del trébol al forraje total se incrementó en 25%, la respuesta del trébol blanco fue similar con la adición o no de 60 kg de N ha⁻¹ al momento de la siembra.

En la etapa de establecimiento de una pradera asociada gramínea-trébol blanco, el crecimiento de la gramínea reduce los niveles de nitrógeno en el suelo, estimulando la fijación de N₂ y el crecimiento del trébol blanco (Beuselinck *et al.*, 1994).

Una vez que el nitrógeno del suelo alcanza niveles altos, por propagación del trébol, el *Rhizobium* disminuye su actividad. La gramínea es estimulada por los altos niveles de N en suelo y el ciclo se repite (Beuselinck *et al.*, 1994).

2.5.2. Competencia de la gramínea con el trébol blanco

Las especies y variedades de gramíneas difieren en la extensión con la que compiten con el trébol y por lo tanto las proporciones de gramínea y trébol que se desarrollan en la pradera gramínea-trébol. Por ejemplo, el trébol rojo fue más compatible con festuca roja que con raigras perenne (Frame, 1990). Pero cuando el trébol rojo se asocia con tres gramíneas y trébol blanco, el aporte del trébol rojo al rendimiento de forraje es poco en el primer año y tiende a desaparecer en el segundo año, con un fuerte dominio del raigras perenne sobre los otros componentes (Badoux, 1993). El trébol blanco sigue un patrón de crecimiento ascendente cuando se asocia con gramíneas perennes, en el año de establecimiento y aporta más al rendimiento total (36%) cuando se asocia con raigras perenne (Tahtacioglu *et al.*, 1999; Badoux, 1993).

Hernández (1986) encontró que a la siembra el trébol blanco fue superado por la gramínea acompañante, ya fuera ésta raigras anual, perenne u ovillo, la dominancia del componente gramínea se mantuvo también en primavera y verano, pero hacia el final del periodo de lluvias, el trébol blanco contrarresta la competitividad del componente gramínea. Este mismo autor indica estudios donde se observó que el trébol blanco podía ser dominante sobre la gramínea

en otoño, invierno y principios de primavera. Frame y Paterson (1987) mencionan que el porcentaje de trébol blanco en asociación con raigras se incrementó de 50% en verano a 72% en otoño. Una tendencia similar encontró Marín (1977), pero con porcentajes de trébol blanco de 44.1% en verano y 58.1% en otoño.

2.5.3. Efecto del pastoreo sobre la asociación gramínea-trébol blanco

La influencia de animales en pastoreo sobre el crecimiento del trébol y la fijación de N_2 no está limitada a la defoliación, pues incluye los efectos de pisoteo, y la excreción de heces y orina. Un efecto de pisoteo es que algunos estolones son cubiertos por el suelo y esto provee algo de protección contra las heladas en invierno (Whitehead, 1995).

La orina suministra una gran cantidad de N soluble que es convertido en amonio y nitrato, que es absorbido por las raíces de trébol y por lo tanto suprime la fijación de N en la mancha de orina. Después de un tiempo la orina también causa muerte de los nódulos y reduce el largo y peso de los estolones. El efecto sustitutivo de la orina sobre la fijación simbiótica de N puede durar de 6 a 8 semanas. Sin embargo, la disminución en el crecimiento del trébol puede persistir por más tiempo (Frame y Paterson, 1987).

Con las heces, particularmente de bovino, hay un efecto por cubrición física o tapado de ambas especies, gramínea y trébol blanco, pero este efecto algunas veces está seguido por una estimulación del crecimiento del trébol blanco, especialmente cuando el suelo es deficiente en fósforo (Whitehead, 1995).

2.6. La asociación ovillo-trébol blanco

Jiménez (1983) evaluó 27 asociaciones de gramíneas y leguminosas, encontrando que la asociación ovillo-trébol blanco es una de las asociaciones que tiene mayor estacionalidad en su curva de producción. El rendimiento a finales del otoño y principios del invierno, está dado principalmente por el trébol blanco. Una vez establecida la asociación ovillo-trébol blanco se tuvieron rendimientos que fueron de 8.3 a 15.7 t MS ha⁻¹ año⁻¹, teniendo mayor rendimiento en condiciones de pastoreo que en condiciones de corte, esto debido a la transferencia de N del trébol blanco hacia el ovillo vía excretas de animales (Mallarino *et al.*, 1990).

Améndola *et al.* (1999) registraron que la asociación trébol blanco-ovillo alcanzó un rendimiento máximo de forraje de 15,673 kg MS ha⁻¹ año⁻¹ con ocho pastoreos al año, cosechando al menos 61.5% del forraje presente. Estos autores resaltan que este rendimiento fue mayor al obtenido con raigrass-trébol blanco en la misma localidad. Sin embargo, Marín (1997) señala que en las primeras cosechas luego de la siembra, la asociación raigrass perenne-trébol blanco rinde más forraje que la de ovillo-trébol blanco, debido a que el ovillo es

menos agresivo y de establecimiento más lento que el raigrass; pero después del primer año, el ovillo y trébol blanco se tornan más agresivos y dominan el dosel, lo que implica un aumento en el rendimiento de forraje. García y Juárez (1994) confirmaron que el ovillo mostró una menor agresividad luego de la siembra en comparación con raigras y festuca, en siembras en asociación con leguminosas.

2.7. Transferencia de nitrógeno de leguminosas a gramíneas

El nitrógeno fijado por el *Rhizobium* e incorporado por la leguminosa puede transferirse al suelo a través de varios mecanismos: liberación de exudados por la raíz, descomposición de nódulos, raíces y hojas e intercambio entre raíces e hifas de hongos micorrizógenos. También una parte puede transferirse en forma de amonio hacia otras plantas asociadas a las leguminosas.

Wani *et al.* (1995) señalaron que la concentración de N en el tejido vegetal de la leguminosa, el grado de maduración y la velocidad de degradación de los residuos, influyeron en la cantidad de N que la leguminosa puede transferir a la gramínea acompañante, esta transferencia puede ser equivalente a una fertilización de 7 a 123 kg N ha⁻¹.

La temperatura y humedad ambientales son factores que determinan la tasa de degradación de los residuos vegetales (Ladd *et al.*, 1984) y así pueden determinar la magnitud de la transferencia de N de la leguminosa a la gramínea;

en condiciones tropicales, con altas temperatura y humedad ambientales hasta 33% de los residuos vegetales pueden ser degradados en un tiempo de 24 semanas o menos (Ofori y Stern, 1986). Otro factor a considerar en la tasa de degradación del tejido vegetal de leguminosas es el contenido de taninos, estos compuestos inhiben la acción de algunas enzimas y promueven la precipitación de proteínas limitando su disponibilidad para ser degradadas, en ambos casos reducen la tasa de degradación (Giller y Vargas, 1996).

El nitrógeno fijado por la leguminosa y contenido en sus tejidos podrá estar disponible en un cultivo siguiente, por lo que en esquema de rotación de cultivos siempre se recomienda la incorporación de una leguminosa. Aplicando este esquema de rotación Peoples y Crosswell (1992) lograron 30% mayor rendimiento en cereales en comparación al cultivo continuo de dichos cereales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento y período experimental

La fase de campo se realizó de junio de 2006 a enero de 2007, en el Campo Agrícola Experimental del Colegio de Posgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México, localizado a 19° 29' N, 98° 54' W y 2250 msnm.

El clima de la región es templado subhúmedo con lluvias en verano, época seca durante el invierno, poca oscilación térmica, temperatura media anual de 15 °C, siendo mayo el mes más cálido y enero el más frío (García, 1988).

3.2. Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos fueron cultivar ovinillo en tres tipos de pradera: monófito, asociada, y con banco de proteína. Para las praderas asociada y con banco de proteína además del ovinillo se usó trébol blanco.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental fue un potrero de 10 x 15 m.

3.3. Prácticas culturales

En los tres tipos de pradera la densidad de siembra fue de 2,292 semillas germinables m^{-2} , número aproximado de semillas obtenido cuando se aplican 25 kg SPV ha^{-1} de ovillo a la siembra, densidad de siembra recomendada en la región (Pérez, 2003).

Para determinar la cantidad de semilla a sembrar y mantener la densidad de siembra especificada, se registró el peso de cinco grupos de 100 semillas cada uno de cada especie (ovillo y trébol blanco). Con el promedio de estas determinaciones se calculó que un kilogramo de semilla de ovillo y trébol blanco contenía 917,114 y 1,693,132 semillas, respectivamente. En la pradera monófito la densidad de siembra fue cubierta con ovillo exclusivamente; en la asociada 80% de la densidad de siembra se cubrió con ovillo y el resto con trébol blanco; y en la de banco de proteína se aplicó la densidad de 2,292 semillas m^{-2} pero en 80% de la superficie del potrero se sembró exclusivamente con ovillo y el otro 20% con trébol blanco.

Una vez realizados estos cálculos, las cantidades de SPV aplicada en campo fueron: 25 kg ha^{-1} de ovillo en la pradera monófito; 20 y 3 kg ha^{-1} de ovillo y trébol blanco, respectivamente, en la asociada; y 25 y 14 kg ha^{-1} de ovillo y trébol blanco, respectivamente, en la pradera con banco de proteína.

El terreno fue barbechado y rastreado con dos pasos para dejar una cama de siembra mullida; el 4 de noviembre de 2005 se realizó la siembra. La siembra fue manual y en hileras, para la pradera monófito las hileras fueron a 50 cm de separación en dirección N-S; en la asociada el ovillo se sembró en hileras a 50 cm y dirección N-S y el trébol blanco en hileras a 3 m de separación en dirección E-O, primero se colocó y tapó la semilla de ovillo y posteriormente la de trébol blanco; para la de banco de proteína, el ovillo y trébol blanco se sembraron, en hileras a 50 cm de separación en dirección N-S, en 80% de la superficie del potrero, se sembró el ovillo y trébol blanco en el 20% restante.

Luego de colocada la semilla fue cubierta con paso de rastrillo procurando una profundidad no mayor a 1.5 cm. Después del tapado de la semilla se aplicó riego rodado a una lámina aproximada de 7 cm, a los 8 días se aplicó un nuevo riego ligero (lámina de 4 cm) para favorecer emergencia, posteriormente los riegos fueron cada 15 días con lámina aproximada de 6-7 cm durante la época de sequía, en la estación de lluvia no se aplicó riego. No se aplicó ninguna fertilización y sólo se realizaron controles manuales de malezas.

Para asegurar un mejor establecimiento de las especies sembradas antes de los pastoreos experimentales se dieron dos cortes y un pastoreo de formación.

3.4. Pastoreos experimentales

Se realizaron un total de cuatro pastoreos experimentales, en cada pastoreo se usaron 18 borregos machos enteros Suffolk, con un peso vivo (PV) promedio de 30 kg, al azar se formaron en nueve grupos de dos borregos cada uno, y cada grupo fue asignado a un potrero.

En 2006 se realizaron tres de los cuatro pastoreos experimentales, el primero inició el 28 de agosto (60 días después del pastoreo de formación); el segundo el 7 de octubre; y, el tercero el 16 de noviembre; el cuarto pastoreo se inició el 9 de febrero de 2007.

Cada uno de los pastoreos experimentales tuvo una duración total de 7 días, para ello los potreros se dividieron en 7 franjas de 2.14 m² en las praderas monófitas y en asociación, y de 1.9 y 1.43 m² para la superficie con ovillo y trébol blanco, respectivamente, en la pradera con banco de proteína. La estancia de los borregos por franja fue de un día en un horario de las 8:00 a las 16:00 h, en la pradera con banco de proteína, la primera hora (8:00 a 9:00 h) los borregos se ubicaban en el área con trébol blanco y el resto del tiempo en el área con ovillo. La secuencia en que fueron pastoreadas las franjas siempre fue la misma en los cuatro pastoreos experimentales.

Durante los pastoreos experimentales los borregos tuvieron acceso al agua solamente en el corral de encierro, lugar en el que permanecían cuando eran

retirados de los potreros. En los intervalos de tiempo entre pastoreos experimentales, los borregos se mantuvieron con una dieta alta en forraje verde y en ocasiones pastoreaban en otras praderas. Para el cuarto pastoreo experimental se usó un diferente grupo de 18 borregos con el mismo manejo que el primer grupo de borregos.

3.5. Variables medidas y calculadas

Poco antes de sembrar se tomaron 10 muestras de suelo con un sacabocado a 15 cm de profundidad, la colecta de las muestras fue siguiendo una trayectoria en zig-zag, cubriendo toda el área experimental, estas 10 muestras se mezclaron para formar una muestra compuesta y en ella se corrió un análisis básico de fertilidad con las determinaciones de pH, materia orgánica (Walkly y Black), nitrógeno total (Kjedahl), fósforo disponible (Olsen), micronutrientes: Cu, Mn, Fe y Zn, extracción con DTPA; y cationes intercambiables, acetato de amonio 1N neutro; (Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-021-RECNAT-2000).

En el suelo de la séptima franja de pastoreo de cada potrero se determinaron las concentraciones de N total, inorgánico y orgánico, estas determinaciones se hicieron: poco antes de iniciar los pastoreos experimentales (estado inicial) y al final del tercero y cuarto pastoreos. En cada momento se tomaron 10 muestras de suelo de la franja, para el caso de praderas con banco de proteína únicamente se muestreó la franja con ovillo.

Las muestras fueron obtenidas con un sacabocados a 10 cm de profundidad, siguiendo una trayectoria en zig-zag a todo lo largo de la franja, las 10 muestras de una misma franja se mezclaron para formar una sola.

La concentración de N total se determinó por el procedimiento de semimicro-Kjeldahl (no incluye nitratos); el N inorgánico por el procedimiento de nitrógeno inorgánico extractable en KCl 2N; el N orgánico fue la diferencia del N total menos el N inorgánico (Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-021-RECNAT-2000).

Con la finalidad de evaluar la fase suelo-planta se determinó un perfil microbiológico con base en la actividad respiratoria en suelo, colonización de micorrizas, identificación de esporas y presencia de nódulos. La descripción del perfil microbiológico se realizó una sola vez, con muestras colectadas un mes antes de aplicar el primer pastoreo experimental. Las determinaciones se realizaron para dar una mejor descripción de los microorganismos del suelo en que se establecieron las praderas.

Para determinar actividad respiratoria y presencia de esporas se siguieron los métodos de Winkler (Félix *et al.*, 1996) y el procedimiento descrito por Ferrera *et al.* (1993), respectivamente. Las muestras de suelo para estas determinaciones se colectaron de la séptima franja de cada potrero, en las praderas con banco de proteína sólo se muestreó sobre el área con ovillo; la franja se dividió en dos partes iguales, en cada parte se tomaron tres muestras

de suelo con un sacabocados a 10 cm de profundidad, siguiendo una trayectoria en zig-zag, estas muestras se mezclaron para conformar dos muestras, estas se usaron como repeticiones de laboratorio. Además de las muestras de suelo de los potreros, se tomaron 10 muestras de suelo con sacabocados a 10 cm de profundidad, del área contigua a la experimental pero que no tuviera vegetación, estas muestras se mezclaron para formar una sola, esta muestra de suelo fue sujeta a determinación de actividad respiratoria y se le consideró como testigo de referencia.

Colonización de micorrizas, reconocimiento de hifas, vesículas y arbuscúlos de las micorrizas, y presencia de nódulos se determinaron en raíces colectadas al mismo tiempo con palas de jardinería, y con igual estrategia que las muestras de suelo para determinar actividad respiratoria y presencia de esporas. En las praderas monófitas se colectaron raíces de ovillo únicamente, en las asociadas de trébol blanco y ovillo, y en las praderas con banco de proteína únicamente se colectaron raíces de trébol blanco. Las raíces de ovillo colectadas en las praderas asociadas siempre se manejaron a parte de las raíces de trébol blanco. La determinación de presencia de nódulos sólo se hizo en raíces de trébol blanco, mediante el conteo de nódulos totales. Para todas las determinaciones se aplicaron los procedimientos descritos por Ferrera *et al.* (1993).

En el primer, segundo y cuarto pastoreos se determinaron las masas de forraje ofrecido y residual. En los tres momentos, las determinaciones se hicieron en la

séptima franja de pastoreo. La masa de forraje ofrecido se determinó el día previo a la entrada de los borregos a la franja, se colocaron dos cuadros de 0.25 m por lado cada uno, la colocación de los cuadros fue sobre un transecto diagonal pre-establecido, de forma que se aseguró nunca colocar los cuadros en un mismo lugar en los tres muestreos realizados. El forraje dentro de cada cuadro fue cortado a ras de suelo, en campo se mezcló el forraje de los dos cuadros para formar una sola muestra.

En el laboratorio se tomó al azar una porción de cada muestra para separarla en hoja, tallo y material muerto por especie si era el caso y maleza, la muestra y los componentes separados fueron pesados luego de secados en estufa de aire forzado a 55 °C hasta peso constante (comúnmente 72 horas), luego de secada y pesada la muestra se conservó para determinar la concentración de N, los componentes fueron desechados una vez pesados.

La masa de forraje residual se determinó una vez retirados los borregos de la franja, el procedimiento fue similar al de forraje ofrecido, asegurando colocar los cuadros en el área adyacente a la colocación de los cuadros al determinar el forraje ofrecido respectivo.

En la pradera con banco de proteína, únicamente en el cuarto pastoreo se determinaron masa de forraje ofrecido y residual en ambas áreas la del trébol blanco y la del ovillo. Con esta información se determinó masas totales de

forraje ofrecido y residual, ya que en los otros pastoreos no se determinó el aporte del trébol en la pradera con banco de proteína.

Las muestras de forraje ofrecido y residual conservadas luego del secado y pesado fueron molidas a criba de 1 mm en un molino Wiley para luego determinarles contenido de N por el método Macrokjeldahl (Harris, 1970); éstas muestras contenían ovillo, material muerto y maleza, en la pradera asociada se quitó el trébol blanco.

En el cuarto pastoreo, al coleccionar las muestras para determinar forraje residual se tomaron también cuatro muestras de raíces de ovillo, para lo cual se usó un sacabocado a 10 cm de profundidad. Para la obtención de las muestras se siguió una trayectoria en zig-zag, solamente se seleccionaron raíces de ovillo y se juntaron en una sola muestra, ésta se secó a 55 °C en estufa de aire forzado hasta peso constante, luego del secado se molió a criba de 1 mm en un molino Wiley para luego determinar concentración de N por el método Macrokjeldahl (Harris, 1970).

En el primer, segundo y cuarto pastoreos se determinó la cantidad de heces y orina producidos por borrego y la concentración de N en ellas, para luego calcular la cantidad de N excretada por borrego y por día. Estas determinaciones se hicieron cuando los borregos pastorearon la quinta franja. Poco antes de entrar a pastorear esta franja se les puso a los borregos un pañal desechable adulto con gelatinizante, al salir de la franja y regresar al corral de

encierro se les retiró este pañal para ponerles uno nuevo que se les retiró poco antes de salir al pastoreo de la sexta franja el día siguiente. Los pañales usados fueron pesados antes y después de ponerlos en los borregos, la diferencia entre estos dos pesos se consideró como la cantidad de orina producida. Al retirar el segundo pañal se les puso a los borregos una bolsa de plástico montada sobre un arnés especial para coleccionar una muestra de orina que sirvió para determinar densidad y concentración de N por el método Macrokjeldahl (Harris, 1970).

Al tiempo que se les puso a los borregos el primer pañal también se les colocó una bolsa para coleccionar las heces, al momento de poner el segundo pañal, las heces en la bolsa fueron retiradas y los borregos mantuvieron la bolsa hasta el tiempo en que se les retiró el segundo pañal, en este momento se repitió el vaciado de heces de las bolsas. Las heces coleccionadas fueron pesadas luego de un secado en estufa de aire forzado a 55 °C hasta peso constante, una vez pesadas se tomó una muestra para determinar la concentración de N por el método Macrokjeldahl (Harris, 1970). El peso de orina y de las heces coleccionadas en el tiempo de pastoreo siempre se manejó aparte de lo coleccionado en el tiempo de encierro de los borregos. Se calculó cantidad total de orina y de las heces medidas en el pastoreo y en el encierro.

3.6. Manejo y análisis estadístico de datos

Las variables de perfil microbiológico de la fase suelo-planta fueron sujetas a análisis de varianza con modelo completamente al azar. Para actividad

respiratoria los tratamientos fueron tipo de vegetación: sin vegetación, ovinillo monófito y ovinillo-trébol blanco asociados; para micorrizas fueron cuatro tratamientos según especie y tipo de pradera: ovinillo-monófito, ovinillo-asociación, trébol-asociación y trébol-monófito (banco de proteína); para cantidad de esporas los tratamientos fueron dos tipos de pradera: ovinillo-monófito y ovinillo-asociación; y en número de nódulos: trébol asociado y monófito en el banco de proteína. Para actividad respiratoria e identificación de esporas los datos obtenidos del suelo con pradera monófito y del suelo con ovinillo en la pradera con banco de proteína se juntaron ya que en ese momento no se había aplicado ningún tratamiento.

El contenido de N en el suelo se analizó como N orgánico e inorgánico, se realizó un análisis de varianza independiente para cada uno de los momentos en que se determinaron estos contenidos.

Para caracterizar el crecimiento de ovinillo crecido en los tres tipos de pradera evaluados se realizaron análisis de varianza independientes para cada uno de los tres pastoreos en que se determinaron los atributos de: masas ofrecidas y residuales de ovinillo, cantidad total de forraje ofrecido de ovinillo (que fue la suma de las cantidades de forraje ofrecido de los tres pastoreos), concentración y rendimiento de N en el forraje ofrecido de ovinillo, el rendimiento de N en el forraje de ovinillo fue el producto de la concentración de N por la masa de forraje ofrecido. También se realizó un análisis de varianza para la concentración de N en raíces de ovinillo, colectadas al final del cuarto pastoreo.

En el cuarto pastoreo se realizaron análisis de varianza para masas totales de forraje ofrecido y residual, concentración y rendimiento de N en estas masas de forraje. En estos análisis se incorporó el aporte del trébol blanco en las praderas asociada y con banco de proteína. Para la pradera con banco de proteína estas variables se calcularon considerando que 80% de la superficie era de ovillo y el 20% restante de trébol blanco.

Las variables medidas en los borregos fueron: concentración (%) de N en heces y orina; cantidad de heces ($\text{g MS borrego}^{-1} \text{ día}^{-1}$), orina ($\text{ml borrego}^{-1} \text{ día}^{-1}$), y de N excretado ($\text{g borrego}^{-1} \text{ día}^{-1}$) en cada una de estas deyecciones en el momento del pastoreo, en el encierro y total al día. Para efecto de análisis de varianza de los dos borregos por potrero se tomó un promedio. La comparación de estas variables fue por análisis de varianza independientes para cada uno de los tres pastoreos.

Los análisis de varianza se realizaron por el procedimiento del modelo lineal general (GLM) del paquete estadístico SAS (2001). En caso de efecto significativo ($p < 0.05$), se procedió a la comparación múltiple de medias por Tukey (Steel y Torrie, 1988).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fertilidad del suelo

El suelo mostró pH de 8.05, medianamente alcalino, por lo que puede tener limitaciones en la disponibilidad de B, Fe, Mn y K; además es pobre en N total (0.082%) y en P disponible (4.47 mg kg⁻¹). El contenido de materia orgánica (2.62%) es medio. Las concentraciones de Fe (8.53 mg kg⁻¹), Zn (1.51 mg kg⁻¹) y Mn (17.55 mg kg⁻¹) son adecuadas, pero la de Cu (0.39 mg kg⁻¹) es marginal para cultivos. El suelo es muy rico en K (468.5 mg kg⁻¹), Ca (1754.74 mg kg⁻¹) y Mg (459.5 mg kg⁻¹). Por tanto, el suelo puede considerarse de fertilidad media con limitaciones en pH, N y P, fundamentalmente.

4.2. Perfil microbiológico de la fase suelo-planta

La actividad respiratoria por microorganismos fue similar ($p>0.05$) en el suelo independientemente del tipo de pradera y ausencia de vegetación (Figura 1). El desarrollo microbiano en el suelo antes de los pastoreos experimentales fue similar.

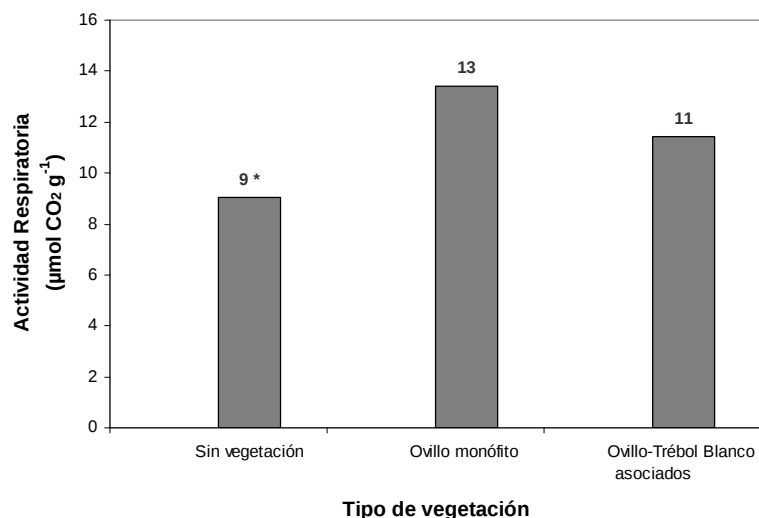


Figura 1. Actividad respiratoria en suelos con diferente vegetación

* Sin efecto ($p > 0.05$) de la vegetación

La colonización por micorrizas de las raíces de ovillo y trébol blanco fue similar ($p > 0.05$), ya sea creciendo como monófitos o en asociación (Figura 2). Esta similitud permite suponer que el potencial de absorción de minerales por parte de las raíces a través de micorrizas fue el mismo al iniciar los pastoreos experimentales.

La colonización por hifas de micorrizas, fue máxima ($p < 0.05$) en raíz de trébol blanco monófito (banco de proteína) una magnitud relativa de colonización 74% mayor que la encontrada en las raíces de ovillo y trébol blanco crecidos en las otras alternativas (Figura 3). La colonización por vesículas, no mostró diferencia ($p > 0.05$) entre raíces de ovillo y trébol blanco crecidos como monófitos o en asociación (Figura 3). En arbuscúlos las raíces de ovillo y trébol blanco crecidos en asociación, presentaron la colonización más ($p < 0.05$) extendida en promedio

la magnitud relativa de colonización fue 1.2 veces mayor a la encontrada en raíces de trébol blanco monófito (Figura 3).

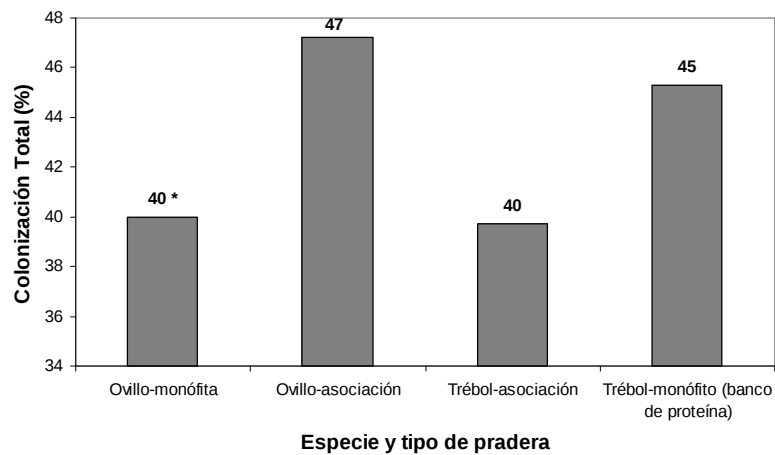


Figura 2. Colonización por micorrizas en raíces de ovillo y trébol blanco crecidos solos y asociados.

* Sin efecto ($p > 0.05$) de especie y forma de cultivo

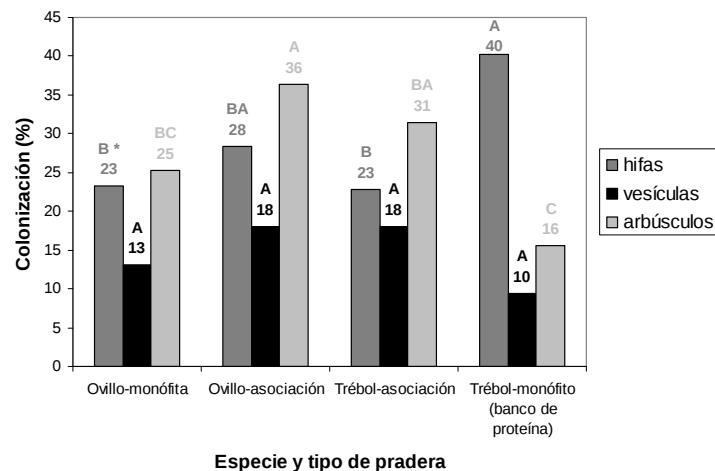


Figura 3. Colonización por estructuras de micorrizas (hifas, vesículas y arbusculos) en raíces de ovillo y trébol blanco crecidos solos y asociados.

* Dentro de estructura medias con al menos una literal en común no son diferentes ($p < 0.05$)

La similitud en colonización por micorrizas en las raíces de ovinillo y trébol blanco indica que los tipos de pradera con estas simbiosis mutualistas se benefician por igual, incrementando la captación de nutrientes minerales del suelo (especialmente fósforo), mejorando el transporte de agua e incrementando la tolerancia a las condiciones adversas del suelo (Ferrera *et al.*, 1993).

La colonización potencial por hongos endomicorrízicos se mide a través de la cantidad de esporas o esporocarpos en el suelo. Los hongos endomicorrízicos que presentan estas esporas son del orden de los Glomales. La presencia de esporas en suelo no varió ($p>0.05$) en base a si la pradera era de ovinillo monófito u ovinillo en asociación con trébol blanco (Figura 4).

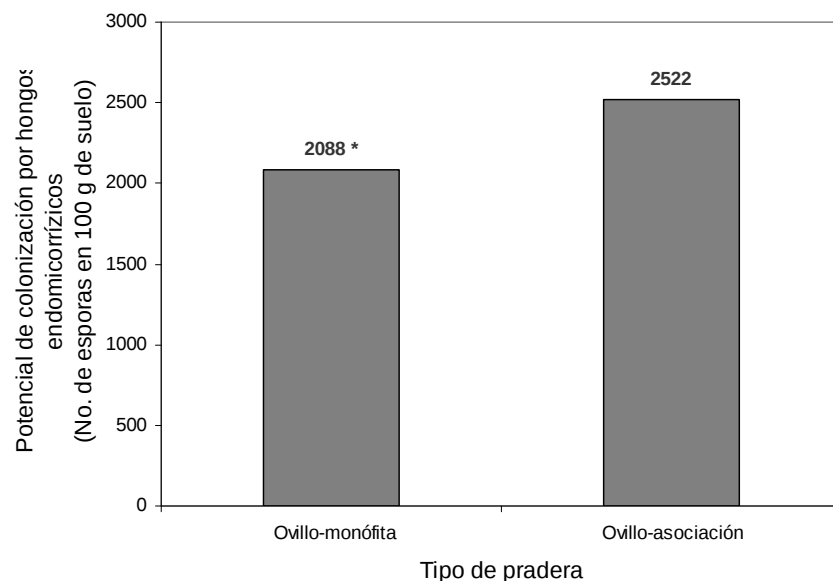


Figura 4. Potencial de colonización por hongos endomicorrízicos en suelo con dos tipos de pradera.

* Sin efecto ($p>0.05$) del tipo de pradera

El trébol blanco mostró similar ($p>0.05$) cantidad de nódulos en raíz fuera crecido monófito (banco de proteína) o en asociación (Figura 5). El trébol blanco asociado o monófito mostró la misma disponibilidad para ser infectado por *Rhizobium*, lo que permite señalar que el potencial para fijación de N fue similar estuviera el trébol en asociación con el ovillo o en forma monófito en el banco de proteína.

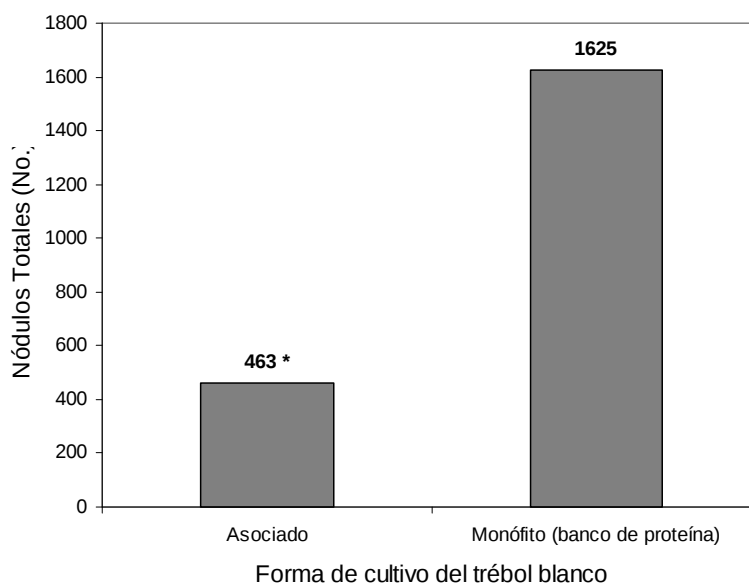


Figura 5. Cantidad de nódulos en raíces de trébol blanco crecido en asociación con ovillo o monófito en banco de proteína.

* Sin efecto ($p>0.05$) de la forma en que se creció el trébol blanco

Con base en los resultados encontrados en este perfil microbiológico de la fase suelo-planta, se puede mencionar que los tres tipos de pradera (ovillo monófito, ovillo-trébol en asociación y con banco de proteína) iniciaron con un suelo de igual potencial en microorganismos benéficos para una mejor absorción de

minerales y para el caso de trébol blanco con similar capacidad para el proceso de fijación de N atmosférico.

4.3. Contenido de nitrógeno en suelo

Las concentraciones de N orgánico e inorgánico fueron similares ($p>0.05$) al inicio de los pastoreos experimentales; la concentración de N orgánico se mantuvo sin cambios ($p>0.05$) por el tipo de pradera luego del tercero y cuarto pastoreos; mientras que la concentración de N inorgánico únicamente varió ($p<0.05$) entre tipos de pradera al final del tercer pastoreo, en este momento, la pradera asociada mostró una concentración de N inorgánico 2.2 veces mayor al promedio de las otras dos praderas, las cuales no mostraron diferencia entre ellas (Cuadro 3).

La concentración de N en el suelo, ya sea orgánico o inorgánico, no fue una característica consistente para demostrar la ganancia en N al introducir una leguminosa, ya sea en pradera asociada o con banco de proteína.

No siempre el cultivo de leguminosas contribuye a enriquecer el suelo con nitrógeno y se ha encontrado un balance negativo con algunas, especialmente cuando se extraen del campo los residuos (Wani *et al.*, 1995). Pero cuando éstos se dejan, el elevado contenido de N de sus hojas asegura su rápida mineralización.

Cuadro 3. Contenidos de nitrógeno orgánico e inorgánico (mg N kg⁻¹ suelo) en suelo donde creció ovillo en tres tipos de pradera y cosechado por pastoreo.

Tipo de nitrógeno	Momento	Tipo de pradera		
		Monófitas	Asociada	Banco de proteína
Orgánico	Inicial	1278 *	611	551
	Final 3 ^{er} pastoreo	986	862	673
	Final 4 ^o pastoreo	885	701	554
Inorgánico	Inicial	21	14	13
	Final 3 ^{er} pastoreo	6 b	16 a	9 b
	Final 4 ^o pastoreo	141	139	165

* Medias en igual hilera con al menos una literal en común o sin literal alguna no son diferentes (p>0.05)

Aún cuando no fue el propósito y por tanto no se realizó un análisis estadístico, sí es importante señalar la fuerte variación en el contenido de N inorgánico de un momento a otro, particularmente al final del cuarto pastoreo, en que el nitrógeno inorgánico mostró una concentración más de 10 veces mayor al promedio de los otros dos momentos previos. La posible mayor concentración de N inorgánico al final del cuarto pastoreo podría indicar una menor absorción del N por parte del ovillo por condiciones limitantes de temperatura ambiental y del suelo durante el periodo invernal.

La variación entre momentos en la concentración de N inorgánico, contrasta con la mayor estabilidad de la concentración del N orgánico que se mantuvo siempre por arriba del inorgánico. Whitehead (1995) menciona que la cantidad de nitrógeno que retorna al suelo por la descomposición de hojas y tallos, varía

ampliamente dependiendo de las condiciones climáticas y del manejo de la pradera (corte o pastoreo, con o sin fertilización nitrogenada).

4.4. Atributos del ovillo

En los tres pastoreos evaluados, el tipo de pradera en el que creció el ovillo determinó ($p < 0.05$) la cantidad de forraje de ovillo al inicio del pastoreo; mientras que el residual de ovillo se mantuvo sin diferencia ($p > 0.05$) entre los tipos de pradera en los tres pastoreos (Cuadro 4).

En el primer pastoreo, la pradera monófitas mostró poco más del doble de forraje ofrecido de ovillo que los otros dos tipos de pradera, los cuales no mostraron diferencia entre ellos; sin embargo, la pradera asociada igualó y en el cuarto superó en forraje ofrecido de ovillo a la monófitas.

La pradera con banco de proteína siempre mostró la menor cantidad de forraje ofrecido de ovillo, al final del cuarto pastoreo la cantidad de ovillo ofrecido en este tipo de pradera fue 44% de la encontrada en la pradera asociada.

Las diferencias en forraje ofrecido de ovillo no pueden explicarse con base en una diferente intensidad de cosecha, ya que en los tres pastoreos evaluados la cantidad de ovillo residual fue similar en todos los tipos de pradera.

Cuadro 4. Forraje ofrecido y residual, de ovillo y otros componentes (kg ha⁻¹) en tres tipos de pradera y tres pastoreos.

		Tipo de pradera		
Tipo de forraje	Componente	Monófitas	Asociada	Banco de proteína
a) Primer pastoreo (28 de agosto de 2006)				
Ofrecido	Ovillo	2131 a*	952 b	965 b
	Maleza	651	488	883
	Material muerto	2501 a	1373 b	1395 b
Residual	Ovillo	747	416	288
	Maleza	717	155	331
	Material muerto	1128 a	813 a	547 b
b) Segundo pastoreo (7 de octubre de 2006)				
Ofrecido	Ovillo	1317 ab	1445 a	736 b
	Maleza	1163	357	1253
	Material muerto	3350	3504	1824
Residual	Ovillo	147	181	211
	Maleza	187 a	51 b	171 a
	Material muerto	419	448	237
c) Cuarto pastoreo (9 de febrero de 2007)				
Ofrecido	Ovillo	576 b	800 a	352 c
	Maleza	45	43	53
	Material muerto	347	365	376
Residual	Ovillo	184	163	184
	Maleza	67	27	27
	Material muerto	181	232	88

* Medias en igual hilera con al menos una literal en común o sin literales no son diferentes (p>0.05)

En el primer pastoreo las cantidades de material muerto en lo ofrecido y residual fueron muy altas y de un comportamiento paralelo al forraje ofrecido de ovillo, el tipo de pradera con mayor forraje ofrecido mostró las mayores cantidades de material muerto. En general, para los tres tipos de pradera el primer pastoreo se realizó en un estado muy avanzado de madurez de las plantas.

En el segundo pastoreo el forraje ofrecido mantuvo un aporte muy alto de material muerto, pero ya en el residual este aporte se redujo marcadamente. En este segundo pastoreo, además de la diferencia en forraje ofrecido de ovillo, también se encontró diferencia ($p < 0.05$) en la cantidad de maleza residual, donde la asociación mostró la menor cantidad.

La cantidad total ofrecida de ovillo acumulada en los tres pastoreos varió ($p < 0.05$) entre los tipos de pradera (Figura 6). El banco de proteína mostró el menor rendimiento de forraje aproximadamente 76% menos forraje que los otros dos tipos de pradera, los cuales no fueron diferentes entre ellos.

La tendencia de la pradera monófito fue a tener menor cantidad de forraje de ovillo ofrecido conforme pasaron los pastoreos, mientras que la asociación mostró una tendencia a mayor cantidad de forraje ofrecido de ovillo, por lo que aún cuando la monófito mostró la mayor cantidad de ovillo en el primer pastoreo, la cantidad acumulada en los tres pastoreos en la pradera asociada y la monófito fue similar.

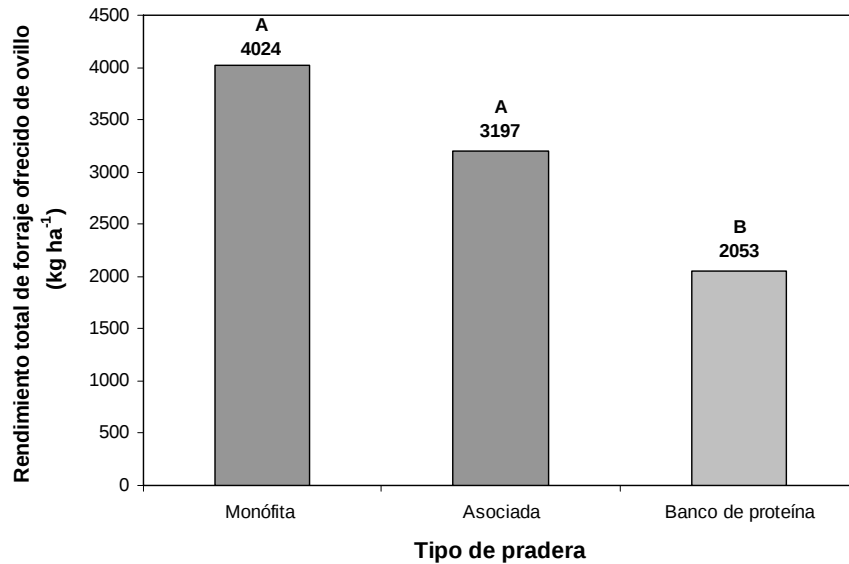


Figura 6. Cantidad total de forraje ofrecido de ovillo crecido en tres tipos de pradera, sumatoria de tres pastoreos.

* Medias con al menos una literal en común no son diferentes ($p < 0.05$)

El resultado en cantidad de ovillo ofrecido en la pradera con banco de proteína no fue el esperado, ya que al menos se esperaba un comportamiento similar al de ovillo en pradera monófito, máximo cuando el residual en todo momento fue similar.

Posiblemente la tendencia del suelo donde se creció la pradera monófito a contener mayor concentración de N total al inicio de los pastoreos experimentales (Cuadro 3) haya promovido la cantidad tan alta de forraje ofrecido de ovillo observada en el primer y segundo pastoreos. Por otro lado, la menor cantidad de forraje ofrecido de ovillo en la pradera con banco de proteína permite suponer que la transferencia de N vía los animales pastoreadores es un

proceso más lento que la transferencia directa que ocurre al crecer el trébol y el ovillo en asociación.

La pradera asociada mostró el mayor contenido de N inorgánico en suelo al final del tercer pastoreo (Cuadro 3), lo que podría indicar que la tendencia a mayor cantidad de forraje ofrecido de ovillo encontrada en este tipo de pradera se debió a una mayor cantidad de N en el suelo producto de una transferencia directa del trébol blanco al resto del sistema pradera, reforzando que esta transferencia directa es más rápida y no requiere de tanto tiempo para mostrar efectos en el crecimiento de la gramínea acompañante en comparación a la posible transferencia vía los animales pastoreadores.

La gradual superioridad de la pradera asociada en cantidad de forraje ofrecido de ovillo en comparación a la pradera monófito pudo ser reflejo de lo señalado por Whitehead (1995), en el sentido de que la magnitud de transferencia a la solución del suelo del N fijado por el trébol blanco se incrementa con la edad del trébol, ya que en los primeros meses luego de sembrado casi todo el N fijado se lo queda el mismo trébol para favorecer su propio crecimiento, además de que en este estado inicial es muy poca la cantidad acumulada de material muerto que es uno de los componentes del crecimiento del trébol blanco mediante el cual se libera N hacia el sistema pradera; Hogh-Jensen y Schjoerring (1997), también coinciden en indicar que en los estados iniciales de establecimiento del trébol blanco el N fijado que es transferido al ambiente no es mayor al 3% del total fijado.

Mallarino *et al.*, (1990) señala que es después de un año de la siembra de muchas de las leguminosas forrajeras en que se da la mayor transferencia hacia el sistema pradera del N fijado.

El tipo de pradera mostró efecto ($p < 0.05$) en la concentración de nitrógeno del forraje ofrecido de ovillo en los dos últimos pastoreos, pero en ninguno de los tres pastoreos en el forraje residual (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración (%) de nitrógeno en la masa de forraje ofrecido y residual de ovillo crecido en tres tipos de pradera y cosechado por pastoreo.

Masa de forraje	Número y fecha de pastoreo		Tipo de pradera		
			Monófito	Asociada	Banco de proteína
Ofrecido	1	28/08/2006	2.1 *	2.1	1.9
	2	07/10/2006	1.8 b	2.3 a	1.7 b
	4	09/02/2007	2.6 b	3.8 a	2.3 b
Residual	1	28/08/2006	1.8	1.9	1.5
	2	07/10/2006	1.5	2.1	2.0
	4	09/02/2007	2.0	2.8	2.4

* Medias en la misma hilera con al menos una letra en común o sin letras no son diferentes ($p < 0.05$)

Cuando el ovillo creció en asociación mostró 31 y 55% mayor concentración de nitrógeno que el promedio del ovillo crecido en pradera monófito o con banco de proteína, en el segundo y cuarto pastoreos, respectivamente. En ambos

pastoreos, el ovillo en pradera monófito y con banco de proteína mostró igual concentración de nitrógeno.

La mayor concentración de N en ovillo al crecer asociado con el trébol blanco, puede indicar que la transferencia del N de una a la otra especie fue directa y que la posible transferencia vía el animal pastoreador fue muy pobre, y que requiere una mayor cantidad de tiempo para poderse evidenciar.

Un nivel inicial alto de N disponible en suelo (Cuadro 3) como una reducida transferencia del N fijado al sistema pradera por estar el trébol blanco en fase de establecimiento (Whitehead, 1995; Høgh-Jensen y Schjoerring, 1997; Mallarino *et al.*, 1990), podrían explicar el no haber detectado un efecto del tipo de pradera en la concentración de N del forraje ofrecido de ovillo durante el primer pastoreo. Posteriormente, el N excretado por los animales pastoreadores no fue suficiente para compensar pérdidas y extracción del mismo, lo que ocasionó una menor disponibilidad de N para el ovillo y con ello una menor concentración cuando creció como pradera monófito o con banco de proteína.

En los tres pastoreos se encontró efecto ($p < 0.05$) del tipo de pradera en el rendimiento de N en la masa de forraje ofrecido de ovillo (Cuadro 6).

En el primer pastoreo, al crecer el ovillo en pradera monófito rindió 2.3 veces más N que el promedio de los otros dos tipos de pradera, los cuales no mostraron diferencia entre ellos. En el segundo pastoreo, el rendimiento de N

en ovillo fue similar en la pradera monófitas y la asociada, y más del doble del rendimiento dado por el ovillo en la pradera con banco de proteína. En el cuarto pastoreo, el crecimiento del ovillo en pradera asociada mostró el máximo rendimiento de N, aproximadamente 2 y 3.8 veces más N por hectárea que el ovillo crecido en pradera monófitas y con banco de proteína, respectivamente.

Cuadro 6. Cantidad de nitrógeno (kg N ha^{-1}) en la masa de forraje ofrecido de ovillo crecido en tres tipos de pradera y cosechado por pastoreo.

		Tipo de pradera		
		Monófitas	Asociada	Banco de proteína
Número y fecha de pastoreo				
1	28/08/2006	55.6 a*	23.9 b	22.1 b
2	07/10/2006	30.5 a	41.0 a	15.4 b
4	09/02/2007	19.1 b	38.1 a	10.0 c

* Medias en igual hilera con al menos una letra en común no son diferentes ($p < 0.05$)

Con base en los rendimientos de N en el forraje ofrecido de ovillo en el cuarto pastoreo, podría estimarse que el trébol blanco en la pradera asociada fue capaz de transferir 19 kg N ha^{-1} en el intervalo de tiempo del tercer al cuarto pastoreos (86 días).

El ovillo en pradera monófitas o con banco de proteína mostró igual concentración de N (Cuadro 5), pero en rendimiento de N en el forraje ofrecido la pradera monófitas superó a la pradera con banco de proteína (Cuadro 6), esta superioridad se explica por tanto en la mayor cantidad de forraje ofrecido de ovillo que mostró la pradera monófitas (Cuadro 4; Figura 6) y esto a su vez a la

tendencia del suelo donde se creció la pradera monófito a un mayor contenido inicial de N orgánico (Cuadro 3). Esta situación puede estar enmascarando el posible efecto de la transferencia del N fijado vía el animal pastoreador.

La pradera asociada ovinillo-trébol blanco favoreció una mayor transferencia del N fijado que en la pradera con banco de proteína, esta mayor transferencia se reflejó en que el ovinillo mostrará mayor cantidad de forraje ofrecido y con mayor concentración de N, lo que a su vez derivó en mayor rendimiento de N por hectárea. Sin embargo, la tendencia a un menor comportamiento productivo del ovinillo en pradera con banco de proteína en comparación al ovinillo en pradera monófito, permite suponer que el crecimiento de ovinillo en la pradera con banco de proteína pudo estar influido por otros factores que enmascararon la posible transferencia del N fijado vía el animal pastoreador. Entre estos factores está la concentración inicial de N en el suelo de la pradera monófito como ya se comentó anteriormente.

La concentración de nitrógeno en raíces de ovinillo, no varió ($p>0.05$) entre los tipos de pradera al final del cuarto pastoreo (Figura 7). La similitud en la concentración de N en raíces contrasta con lo encontrado en la masa de forraje ofrecido, en donde el ovinillo en pradera asociada superó al ovinillo en las otras praderas y coincide con la similitud en concentración de N en la masa residual (Cuadro 5). Este patrón de respuesta puede ser indicativo de que el N fijado por el trébol blanco y transferido al ovinillo es rápidamente enviado a los puntos de

formación de nuevo tejido en la parte aérea del ovillo y que es la más fácilmente cosechada por el animal en pastoreo.

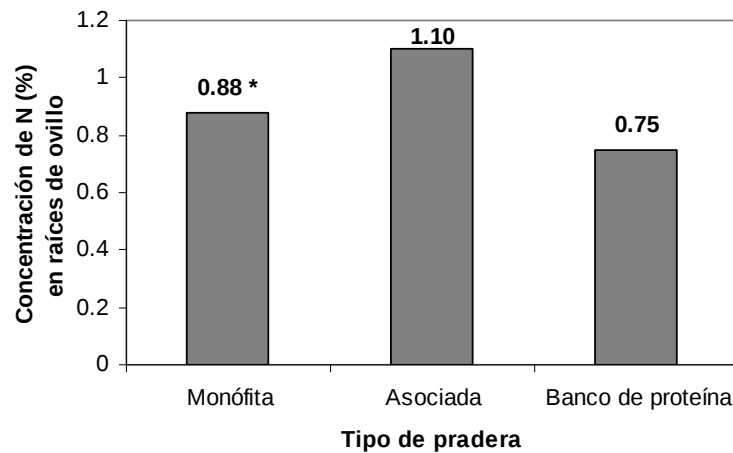


Figura 7. Concentración de nitrógeno en raíces de ovillo crecido en tres tipos de pradera al final del cuarto pastoreo.

* Sin efecto ($p > 0.05$) del tipo de pradera

El presente estudio no encontró lo señalado por Whitehead (1995), en cuanto a que las praderas asociadas gramínea-leguminosa tienden a presentar una mayor concentración de N en la masa radical aún en comparación a praderas de gramíneas sujetas a fertilización nitrogenada. Esta discrepancia podría ser indicativa de que las condiciones ambientales en las que se realizó el presente estudio fueron quizás más favorables a una rápida translocación del N absorbido hacia los puntos de síntesis de nuevo tejido aéreo.

4.5. Características de la pradera en el cuarto pastoreo

En el Cuadro 7 se muestran atributos de los tres tipos de pradera evaluados pero con la incorporación del aporte del trébol blanco en las praderas asociada y con banco de proteína.

Cuadro 7. Atributos (kg ha⁻¹) de tres tipos de pradera en el cuarto y último pastoreo experimental.

Atributo	Componente	Tipo de pradera		
		Monófito	Asociada	Banco de proteína
Forraje Ofrecido	Ovillo + Trébol	576 c*	2064 a	1307 b
	Trébol blanco		1264 a	2256 a
	Maleza	45 a	43 a	91 a
	Material muerto	347 a	365 a	376 a
Forraje Residual	Ovillo + Trébol	184 b	379 ab	472 a
	Trébol blanco		216 b	829 a
	Maleza	67 a	27 a	35 a
	Material muerto	181 a	232 a	88 a
Rendimiento de N en el forraje	Ofrecido	19 c	94 a	54 b
	Residual	5 b	14 ab	18 a

* Medias en la misma hilera con al menos una letra en común no son diferentes ($p>0.05$)

La pradera asociada mostró la máxima ($p<0.05$) cantidad de masa ofrecida de forraje, 72 y 37% por arriba de la encontrada en las praderas monófito y con banco de proteína, respectivamente. Al incorporar el aporte del trébol blanco, la pradera con banco de proteína mostró poco más del doble de masa ofrecida de forraje que la pradera monófito, señalando la alta productividad del trébol blanco

hacia el otoño e invierno en comparación al ovillo, situación que ha sido señalada por otros autores (Améndola *et al.*, 1999; Marín, 1997; Román y Zúñiga, 1996; García y Juárez, 1994; Jiménez, 1983) en esta misma región.

La masa ofrecida de trébol blanco no varió ($p>0.05$) sea que el trébol se crezca en asociación con el ovillo o de manera monófito en el área de banco de proteína. Esta situación es de relevancia ya que en la pradera asociada además de la posible competencia del ovillo, la densidad de siembra del trébol blanco fue 78% menor en comparación a la de la pradera con banco de proteína. El trébol blanco una vez establecido puede desarrollar una gran agresividad para colonizar nuevas áreas debido a su crecimiento estolonífero y con ello compensar por diferencias iniciales en su comportamiento productivo debido a distinta densidad de siembra.

La similar cantidad de masa ofrecida de trébol blanco entre las praderas asociada y con banco de proteína evidencia que la diferencia en la cantidad de masa ofrecida de forraje fue debida al distinto comportamiento del ovillo.

La presencia en el forraje ofrecido de material muerto y maleza fue similar ($p>0.05$) en los tres tipos de pradera. En la masa de forraje residual es importante señalar que se registró una tendencia a un mayor rechazo del trébol blanco cuando es ofrecido de manera monófito (banco de proteína) en comparación a cuando es ofrecido en asociación, esto se deriva de encontrar

que la masa residual de trébol blanco fue casi cuatro veces mayor en la pradera con banco de proteína que en la pradera asociada.

Incorporar una leguminosa ya sea en asociación o como banco de proteína originó un mayor rendimiento de N en el forraje ofrecido como en el residual, señalando la importancia de la leguminosa como un componente de pradera rico en proteína. La pradera asociada mostró el máximo rendimiento de N en el forraje ofrecido casi 5 y 1.7 veces más N que en las praderas monófitas y con banco de proteína, respectivamente. El mayor rendimiento de N en el forraje ofrecido de la pradera asociada se puede explicar con base a la mayor cantidad de forraje ofrecido de ovillo (Cuadro 4) como a la mayor concentración de N en ese mismo forraje (Cuadro 5).

En la masa de forraje residual la tendencia fue a un mayor rendimiento de N en la pradera con banco de proteína, esto se asocia con una mayor masa de forraje residual de trébol blanco encontrada en la pradera con banco de proteína en comparación a la pradera asociada.

El mejor comportamiento agronómico de la pradera con banco de proteína en comparación a la pradera monófitas, indica que la incorporación de trébol blanco por si misma tiene un efecto complementario al crecimiento de ovillo independiente de la posibilidad de enriquecer al sistema pradera con la transferencia del N fijado.

4.6. Contenido de nitrógeno en heces

En el segundo y cuarto pastoreo, el tipo de pradera determinó diferencias ($p < 0.05$) en alguno de los atributos medidos en las heces; pero en el primer pastoreo ninguno de los tres atributos medidos mostró efecto ($p > 0.05$) del tipo de pradera (Cuadro 8).

Posiblemente la gran acumulación de material muerto presente en los tres tipos de pradera al momento del primer pastoreo pudo evitar el poder encontrar diferencias.

La pradera asociada promovió la máxima concentración de N en heces en el segundo y cuarto pastoreos; aunque en el cuarto pastoreo este efecto se registró solamente en las heces colectadas durante la fase de encierro de los borregos. La pradera con banco de proteína promovió heces con una concentración de N similar o un poco por debajo de la pradera asociada.

Solamente en el cuarto pastoreo la producción diaria de heces mostró efecto del tipo de pradera, la máxima cantidad de heces producidas fue con la pradera asociada y el menor valor fue en la pradera monófito.

Cuadro 8. Concentración de nitrógeno (%), cantidad (g MS borrego⁻¹ día⁻¹) y cantidad de nitrógeno excretado (g borrego⁻¹ día⁻¹) en heces de borregos pastoreando tres tipos de praderas.

Atributo	Momento de muestreo	Tipo de pradera		Banco de proteína
		Monófito	Asociada	
a) Primer pastoreo (28 de agosto de 2006)				
Concentración N	Pastoreo ^{&}	2.4 *	2.6	2.5
	Encierro	2.3	2.8	2.3
Cantidad heces	Pastoreo	92	84	122
	Encierro	67	67	115
	Total	159	150	237
N excretado	Pastoreo	2.2	2.2	3.2
	Encierro	1.5	1.8	2.7
	Total	3.7	4.0	5.9
b) Segundo pastoreo (7 de octubre de 2006)				
Concentración N	Pastoreo	1.7 c	2.3 a	2.0 b
	Encierro	1.8 b	2.3 a	2.0 a
Cantidad heces	Pastoreo	196 a	139 b	169 ab
	Encierro	101	94	91
	Total	297	233	260
N excretado	Pastoreo	3.3	3.1	3.4
	Encierro	1.8	2.1	1.9
	Total	5.1	5.2	5.3
c) Cuarto pastoreo (9 de febrero de 2007)				
Concentración N	Pastoreo	2.4	2.7	2.6
	Encierro	2.4 b	2.7 a	2.5 ab
Cantidad heces	Pastoreo	88	134	110
	Encierro	114	235	183
	Total	202 b	369 a	293 ab
N excretado	Pastoreo	2.1	3.6	2.9
	Encierro	2.7	6.4	4.6
	Total	4.8 b	10.0 a	7.5 ab

[&] Heces colectadas mientras los borregos estuvieron en pastoreo (8:00 a 16:00 h) y en encierro (16:00 a 8:00 h)

* Medias en la misma hilera con al menos una letra en común o sin letras no son diferentes (p>0.05)

Aún cuando en dos de los pastoreos evaluados la concentración de N en heces de los borregos expuestos a trébol blanco (praderas asociada y con banco de proteína) fue mayor que en las heces de los borregos en pradera monófitas, solamente en un pastoreo (cuarto pastoreo) la cantidad total de N excretado en heces fue superior en los borregos en las praderas con trébol blanco en comparación a los borregos en la pradera monófitas, esta superioridad estuvo asociada también a que los borregos produjeron una mayor cantidad de heces y no únicamente por tener las heces una mayor concentración de N.

La variación en la cantidad de heces limitó encontrar en forma consistente una mayor excreción de N vía las heces de borregos consumiendo el trébol banco; sin embargo, la concentración de N en las heces fue un atributo que con mayor consistencia demostró que la incorporación de trébol blanco en la pradera promovió una mayor excreción de N. Posiblemente los borregos en pastoreo de la pradera asociada tuvieron un consumo más homogéneo a través del día del trébol blanco en comparación a los borregos en la pradera con banco de proteína y esto a su vez pudo ocasionar la tendencia a que las heces de estos borregos mostraran una menor concentración de N.

Mallarino *et al.* (1990), indican que la transferencia del N fijado vía el animal pastoreador se incrementa conforme se acumula el tiempo en que el animal es expuesto a la leguminosa y conforme la leguminosa muestra un mayor crecimiento. En el presente estudio los borregos en cada periodo de pastoreo sólo acumulaban un máximo de cuatro días en el pastoreo de las praderas

antes de realizar la toma de muestras de las heces, lo que pudo evitar encontrar un mayor impacto del consumo del trébol blanco y por tanto en la transferencia del N.

Las concentraciones de nitrógeno obtenidas en el presente estudio fueron ligeramente mayores a la propuesta por Whitehead (1995), de 2.33%, cuando pastorearon praderas de trébol blanco-gramínea.

En promedio, en el presente estudio, los borregos produjeron 263 y 288 g de heces día⁻¹, para el segundo y cuarto pastoreo, respectivamente. Estos valores son ligeramente inferiores al intervalo de 300 a 600 g heces día⁻¹ registrado por Holmes (1989; citado por Whitehead, 1995). La cantidad de nitrógeno excretado en heces fue aumentando conforme pasaron los pastoreos de 4.8, 10 y 7.5 g N borrego⁻¹ día⁻¹, para el primer, segundo y cuarto pastoreo, respectivamente. Sin embargo, la cantidad de nitrógeno excretado en heces es mayor del intervalo que reportan Parson *et al.* (1991; citados por Whitehead 1995), que oscila entre 5 y 7 g N borrego⁻¹ día⁻¹.

4.7. Contenido de nitrógeno en orina

En el Cuadro 9 se muestra que en ninguno de los tres pastoreos evaluados se encontró efecto ($p > 0.05$) del tipo de pradera en los atributos medidos.

Cuadro 9. Concentración de nitrógeno (%), cantidad (ml borrego⁻¹ día⁻¹) y cantidad de nitrógeno excretado (g borrego⁻¹ día⁻¹) en la orina de borregos pastoreando tres tipos de praderas.

Atributo	Momento de muestreo	Tipo de pradera		Banco de proteína
		Monófito	Asociada	
a) Primer pastoreo (28 de agosto de 2006)				
Concentración N		0.6 *	0.8	0.7
Cantidad orina	Pastoreo ^{&}	284	326	378
	Encierro	325	373	446
	Total	609	699	824
N excretado	Pastoreo	1.8	2.4	2.7
	Encierro	2.2	2.8	3.2
	Total	4.0	5.2	5.9
b) Segundo pastoreo (7 de octubre de 2006)				
Concentración N		0.9	0.8	0.9
Cantidad orina	Pastoreo	305	349	378
	Encierro	426	404	353
	Total	731	753	732
N excretado	Pastoreo	2.8	2.9	3.4
	Encierro	4.0	3.5	3.0
	Total	6.8	6.4	6.4
c) Cuarto pastoreo (9 de febrero de 2007)				
Concentración N		1.1	0.9	1.5
Cantidad orina	Pastoreo	254	340	314
	Encierro	337	432	431
	Total	591	772	745
N excretado	Pastoreo	2.9	2.5	5.0
	Encierro	3.2	4.0	6.4
	Total	6.1	6.5	11.4

[&] Orina colectada mientras los borregos estuvieron en pastoreo (8:00 a 16:00 h) y en encierro (16:00 a 8:00 h)

* Sin efecto ($p > 0.05$) de tipo de pradera en ninguno de los atributos

El consumo del trébol blanco en las praderas asociada y con banco de proteína no fue el suficiente para dar efecto mayor de excreción de N en orina. La concentración y cantidad de nitrógeno en orina resultaron características con alta variabilidad por lo que quizás el número de repeticiones no fue el suficiente.

En el primer, segundo y cuarto pastoreo en promedio, cada borrego excretó un total de 711, 739 y 703 ml de orina día⁻¹ y un total de 5, 6.5 y 8 g de N en esa orina, respectivamente. La similitud entre los tipos de pradera en cantidades de N excretado en orina, permite suponer que la transferencia de N de la leguminosa a la gramínea se convierte en un componente importante a través del tiempo. Mallarino *et al.* (1990) indicaron que el porcentaje de transferencia de N del primer año fue aproximadamente 20%, y en el segundo año aumentó a 60%; también la cantidad de N ha⁻¹ fue mayor en el segundo año, con valores de 18 y 34 kg N ha⁻¹ para el primero y segundo año, respectivamente.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación evidencian que al establecer una pradera de ovillo en asociación con trébol blanco, la leguminosa transfiere nitrógeno a la gramínea de manera directa y que esta transferencia se evidencia por incrementar el rendimiento de la pradera.

En términos cuantitativos, la transferencia de nitrógeno se reflejó en un incremento gradual en la concentración de nitrógeno en el forraje de ovillo, lo que a su vez derivó en un mayor rendimiento de nitrógeno por hectárea y en la cantidad de forraje de ovillo.

El pastoreo es una forma de aprovechamiento del forraje, que permite la transferencia de nitrógeno del trébol blanco al ovillo; el animal pastoreador sirvió como un mecanismo de transferencia en forma indirecta por medio de las heces.

La pradera con los mejores resultados agronómicos fue la de ovillo asociado con trébol blanco este mejor comportamiento evidenció que la transferencia directa del nitrógeno fijado de una a la otra especie fue mayor; mientras que el animal pastoreador aún cuando es una vía de transferencia indirecta requiere de mayor tiempo para mostrar efecto en los atributos agronómicos. Por tanto, en lo posible se propone como una mejor alternativa para una rápida transferencia de nitrógeno el crecer ovillo y trébol blanco en asociación.

6. LITERATURA CITADA

- Améndola M., R. D., A. C. García, and R. J. Juárez. 1999. Grass-legume mixtures under grazing. *In: XVIII International Grassland Congress*. Toronto, Canadá. 1. 22: 121-122.
- Badoux, S. 1993. Utilisation of tall fescue in pure stand, in association with white clover and in complex mixtures. *In: Proceedings of the XVII International Grassland Congress*. 1993: 895-897.
- Baker, M. J., and W. M. Williams, 1989. White clover. CAB International. New Zeland. pp: 214-230.
- Beuselinck, P. R., J. H. Bouton, W. O. Lamp, A. G. Matches, M. H. McCaslin, C. J. Nelson, L. H. Rhodes, C. C. Sheaffer, and J. J. Volenec. 1994. Improving legume persistence in forage crop systems. *Journal of Production Agriculture*. 7 (3): 287-320.
- Boller, B. C., and J. Norberger. 1987. Symbiotically fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed whit ryegrasses at low levels of ^{15}N fertilization. *Plant and Soil*. 104: 219-226.
- Brill, W. J. 1977. Fijación Biológica de Nitrógeno. *Investigación y Ciencia* No. 8. (Edición en español de Scientific American). 12 p.
- Broughton, W. J. 1981. Nitrogen Fixation. Volumen 1: Ecology. Oxford University Press. 305 p.
- Carambula, M. 1977. Producción y Manejo de Pasturas Sembradas. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur, S. R. L. Montevideo, Uruguay. 464 p.

- Cooper, M. McG., and W. D. Morris. 1986. Agricultura Forrajera. Ed. El Ateneo. Argentina. 196 p.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del Suelo: un Enfoque Exploratorio. Ed. Paraninfo. España. 415 p.
- Curll, M. L., and R. J. Wilkins. 1982. Frequency and severity of defoliation of grass and clover by sheep at different stocking rates. Grass and Forage Science. 37: 291-297.
- Date, A. R. 1991. Nodulation success y persistence of recommended inoculum strains for subtropical and tropical forage legumes in Northern Australia. Soil Biol. Biochem. 23: 533-541.
- Deinum, B., and L. Sibma. 1980. Nitrate content of herbage in relation to nitrogen fertilization and management. *In*: Proceedings of an International Symposium of the European Grassland Federation. The role of nitrogen in intensive grassland production. Netherlands. pp: 95-102.
- Dorantes J. J. 1997. Evaluación de la inclusión de diferentes leguminosas en la asociación avena-ballico bajo pastoreo en invierno. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 73 p.
- Durán V., J. A. 1994. Respuesta de las gramíneas forrajeras tropicales a la fertilización nitrogenada en México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 148 p.
- Dutto, P., C. Labandera, A. Milián, D. Risso y F. Formoso. 1999. Efecto del número de rizobios por semilla en la producción de materia seca del trébol blanco. Uruguay. <http://fp.chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/rhizosp.htm>.

- Engels, C., and H. Marschner. 1995. Plant uptake and utilization of nitrogen. *In*: Nitrogen fertilization in the environment. P. E. Bacon [Ed]. Marcel Dekker, Inc. New York, E.U.A. cap. 41-82
- Félix, S. J. N., C. T. Gutiérrez, P. A. Lemos, J. M. A. Ortiz, E. N. L. Pescador y F. L. Varela. 1996. Manual de laboratorio de ecología microbiana. Instituto Politécnico Nacional. México. 180 p.
- Ferrera, C. R., Ch. M. del C. A. González y M. M. de las N Rodríguez. 1993. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas. México. 142 p.
- FIRA. 1986. Instructivos Técnicos de Apoyo para la Formulación de Proyectos de Financiamiento y Asistencia Técnica. Serie Ganadería. Forrajes. México. 256 p.
- Flores, M. J. A. 1994. Bromatología Animal. 7^a edición. Ed. Limusa. México, D.F. 1096 p.
- Frame J. 1990. The role of red clover in the United Kingdom pastures. *Outlook on Agriculture*, 19: 49-55.
- Frame, J., and D.J. Paterson. 1987. The effect of strategic application and defoliation systems on the productivity of a perennial ryegrass-white clover sward. *Grass and Forage Science*. 42: 271-278.
- García, A. C. y R. J. Juárez. 1994. Evaluación bajo pastoreo de diferentes asociaciones de gramínea-leguminosa en Chapingo. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 89 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Copen. México, D.F. 217 p.
- Giller, K. L. y E. Vargas. 1996. Leguminosas tropicales proveedoras y pilladoras de nitrógeno. XVIII Reunión Lat. Rhiz. Santa Cruz de la Sierra Bolivia, Res. p. 19.

- Harris, L. 1970. Métodos para el Análisis y la Evaluación Biológica de los Alimentos para Animales. Universidad de Florida. Gainesville, Florida.
- Hernández, G. A. 1986. Determinación de la calidad de materia seca en 27 asociaciones en gramíneas y leguminosas forrajeras de clima templado en su primer año de cultivo. Tesis profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 88 p.
- Hogh-Jensen, H., and J. K. Schjoerring. 1997. Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N₂ fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. *Plant and Soil*. 197: 187-199.
- Hollowell, E. A. 1984. Tréboles blancos y Ladino. *In*: Hughes, H. D., Heath E. M. y Mectalfe S. D. 1984. Forraje. Ed. CECSA. México, D.F.
- Hughes D. H., E. M. Heath y S. D. Mectalfe. 1981. Forrajes. Traducción por J. L. de la Loma. Ed. CECSA. México, D.F. 758 p.
- Jiménez, M. A. 1983. Curva de producción de 27 asociaciones de gramíneas y leguminosas forrajeras de clima templado. Tesis Profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 60 p.
- Jiménez, M. A. y M. C. Avendaño. 1988. Producción de Forrajes. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 326 p.
- Juscafresa, B. 1983. Forrajes, fertilizantes y valor nutritivo. 2^a Ed. Editorial Aedos. Barcelona, España. 203 p.
- Ladd, J. N., J. H. Buttler, and M. Amato. 1984. The role of microorganisms in a sustainable agriculture. *Proc. Int. Meeting Wye, England*. p. 269.
- Langer, R. H. M. 1981. Las pasturas y sus plantas. Traducido por Ing. Agr. Patricia L. Elizondo. Ed. Hemiesferio Sur. Montevideo, Uruguay. 515 p.

- Ledgard, S. T., and K. E. Giller. 1995. Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. *In: Nitrogen fertilization in the environment*. P. E. Bacon [Ed]. Marcel Dekker, Inc. New York, E.U.A. pp: 443-486.
- Ledgard, S.F. 1991. Transfer of fixed nitrogen from white clover to associated grasses in swards grazed by dairy cows estimated using ¹⁵N methods. *Plant and Soil*. 131: 215-223.
- Mallarino, A. P., W. F. Wedin, C. H. Perdomo, R. S. Goyenola, and C. P. West. 1990. Nitrogen transfer from white clover, red clover and birdsfoot trefoil to associated grass. *Agronomy Journal*, 82: 790-795.
- Marín, S. O. 1997. Evaluación de variedades Neozelandesas de ballico perenne (*Lolium perenne* L.) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en Chapingo, México. Tesis Maestro en Ciencias. Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 60 p.
- Marschner, H. 1997. Mineral Nutrition of Higher Plants. Edit. Academic Press. San Diego, U.S.A. 889 p.
- McIlroy, R. J. 1984. Introducción al cultivo de los pastos tropicales. 3ª edición. Limusa. México. pp: 34-86.
- Muslera, P. E. y G. C. Ratera. 1991. Praderas y Forrajes; producción y aprovechamiento. Ed. Mundi-prensa. 2ª. Ed. Madrid, España. 673 p.
- Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-021-RECNAM-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Nación. Primera Sección 7. Martes 17 de octubre de 2000. México.

- Ofori, F., and W. R. Stern. 1986. Maize/cowpea intercropping of *Azospirillum* an evaluation of 20 years worldwide field inoculations. *Field Crop Res.* 14: 247.
- Pelczar, J. M., P. R. Ried y S. C. E. Chane. 1982. Microbiología. 2ª Edición. Mc Graw-Hill. EUA.
- Peoples, M. B., and E. T. Crosswell. 1992. Biological nitrogen fixation investments expectation and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil.* 141: 13.
- Pérez, B. J. M. 2003. Características agronómicas de praderas de ovillo (*Dactylis glomerata*) con diferente densidad de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 84 p.
- Ramírez, L. M. 1973. El trébol Ladino, una buena leguminosa para praderas. Dirección General de Extensión Agrícola. Chapingo, México. Tríptico.
- Román, de la C. J. F. y R. C. Zúñiga. 1996. Evaluación de variedades Neozelandesas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y ballico perenne (*Lolium perenne* L.) en su etapa de establecimiento en Chapingo. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 133 p.
- Sapek, A. 1997. Nitrogen Balances in Permanent Grassland. Gaseous Nitrogen Emissions from Grasslands. Eds. S.C. Jarvis and B.F. Pain. Institute of Grassland and Environmental Research. CAB International. North Wyke, Okehampton, U.K. pp 391-396.
- SAS. 2001. S.A.S. User's guide: Statistics. 8th ed. SAS Institute Inc., Cary, N.C. USA.
- Soto, L., C. M. A. Laredo, and M. E. Alarcón. 1980. Digestibility and intake of kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum* Hochst) with low fertilizer nitrogen by sheep. *Rev. del Inst. Colombiano Agrop.* 15: (2): 79-90.

- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie, 1988. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2^a Edición. Ed. Mc Graw Hill. México. 622 p.
- Swift, G., M. W. Morrison, A. T. Cleland, C. A. B. Smith-Taylor, and J. M. Dicksson. 1992. Comparison of white clover varieties under cutting and grazing. Grass and Forage Science. 47: 8-13.
- Tahtacioglu, A. L., A. Mermer, and M. Avey. 1999. Monitoring productivity and quality of grass-legume pastures under irrigated condition. XVIII International Grassland Congress. Toronto, Canada. Volumen 1. 57: 57-58.
- Wani, S. P., O. D. Rupela, and K. K. Lee. 1995. Sustainable agriculture in the semiarid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant and Soil. 174: 29.
- Whitehead, D. C. 1995. Grassland Nitrogen. CAB International. Hurley, U. K. 397 p.