

## Estatus hídrico y discriminación isotópica de $^{13}\text{C}$ de dos pasturas convencionales de Uruguay

Berriel Verónica<sup>1</sup>, Mori Cristina<sup>1</sup>, Perdomo Carlos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Aplicaciones en Tecnología Nuclear en Agricultura Sostenible. Departamento de Suelos y Aguas. Facultad de Agronomía. Universidad de la República (Udelar). Garzón 809, 12900 Montevideo, Uruguay  
Correo electrónico: vberriel@gmail.com

Recibido: 26/8/13 Aceptado: 22/5/14

### Resumen

En pasturas mezcla las gramíneas y leguminosas compiten por agua, pero las habilidades competitivas no dependen sólo de sus diferentes capacidades de absorción, sino también de sus capacidades para la regulación de las pérdidas de agua por disminución de la conductancia estomática. Esto se refleja en una menor discriminación isotópica de C ( $\Delta$ ). En este trabajo se estudiaron los cambios en el contenido hídrico (CH) y de  $\Delta$  de plantas de trébol blanco en una pastura pura y de trébol blanco, lotus y festuca en una pastura mezcla durante un ciclo invierno-primaveral en un experimento localizado en el sur de Uruguay. De invierno a primavera ocurrió un descenso de CH para festuca y trébol blanco en ambas praderas, pero el declive de  $\Delta$  ocurrió en todas las especies. En primavera existió una relación lineal entre  $\Delta$  y CH para trébol blanco y festuca, demostrando que  $\Delta$  fue un buen indicador del estatus hídrico. También se encontraron relaciones entre  $\Delta$  y varias variables climáticas, dado que las mismas se relacionaron con cambios en la disponibilidad o en la demanda hídrica. Debido a la competencia que ejerció la gramínea por agua, el valor de  $\Delta$  de trébol blanco fue menor en la pastura mezcla y el rendimiento también disminuyó. Por tanto, el uso de  $\Delta$  puede resultar útil para evaluar el impacto del déficit hídrico en la productividad y en los cambios de composición florística de praderas mezcla, ya que este indicador es capaz de integrar el estatus hídrico de las especies vegetales.

**Palabras clave:** discriminación isotópica de carbono, pastura mezcla, trébol blanco

### Summary

## Water Status and $^{13}\text{C}$ Isotope Discrimination in Two Conventional Pastures of Uruguay

Grasses and legumes in a mixed pasture compete for water, but their competitive ability depends not only on their different absorption capacity, but also on their capacity to regulate water loss by decreasing stomatal conductance. This is reflected in a smaller carbon isotope discrimination ( $\Delta$ ). In this work we studied the changes in water content (WC) and  $\Delta$  in a pure white clover pasture and in a mixed sward of white clover, lotus and tall fescue, for a winter-spring cycle in an experiment located in southern Uruguay. From winter to spring, WC decreased for fescue and white clover in both pastures, but  $\Delta$  declined in all species. In spring there was a linear relationship between  $\Delta$  and WC for white clover and fescue, showing that  $\Delta$  was a good indicator of water status. We also found relationships between  $\Delta$  and several climatic variables, showing that they were indicators of changes in water availability or water demand. Due to the grass competition for water, the  $\Delta$  value of white clover was lower in the mixed sward, and yield also decreased. Therefore,  $\Delta$  can be a useful tool to assess the impact of water deficit on the productivity and botanical composition of mixed grasslands, because this index is a proxy the water status of plants.

**Key words:** Carbon isotope discrimination, mixture pasture, white clover

## Introducción

La producción animal intensiva de Uruguay está basada principalmente en pasturas mezcla de gramíneas y leguminosas (Rebuffo *et al.*, 2006). Esta fuente de forraje presenta ventajas ya que la variedad de especies presentes mejora la captura de los nutrientes (Connolly *et al.*, 2009) y de la luz (Thornley, 2001), además de que las leguminosas no sólo fijan nitrógeno (N) del aire sino que también lo transfieren a las gramíneas (Mallarino *et al.*, 1990). Una desventaja, sin embargo, es la competencia interespecífica por agua, lo cual puede afectar la producción de materia seca de la mezcla y la sobrevivencia de alguna de estas especies (Marriott, 1988), por lo cual en situaciones de déficit hídrico las estrategias de tolerancia de dichas especies pueden jugar un rol importante en su sobrevivencia (Kramer, 1983).

Una de estas estrategias para evitar el estrés hídrico es reducir las pérdidas de agua por transpiración. Esta capacidad está diferentemente desarrollada entre especies y genotipos; por ejemplo en situaciones de baja disponibilidad hídrica o de alta demanda atmosférica se ha encontrado una mayor reducción de la conductancia estomática en las gramíneas *Festuca arundinacea* y *Lolium multiflorum* que en las leguminosas *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Macroptilium atropurpureum* (Lucero *et al.*, 2000; Suriyagoda *et al.*, 2011; Lazaridou *et al.*, 2013). Otro mecanismo para evitar el estrés que se acciona en condiciones de déficit hídrico es la capacidad de crecimiento diferencial de la raíz (Kramer y Boyer, 1995), la cual está más desarrollada en las gramíneas que en las leguminosas, originando la estructura radical más ramificada y profunda de las primeras, que optimiza la captura de agua. Debido a estas desventajas se ha constatado que el trébol blanco es un débil competidor por agua cuando crece en mezcla con gramíneas, sobre todo en períodos de déficit hídrico (Sanderson *et al.*, 2005) donde incluso puede hasta desaparecer de la pastura.

Una de las metodologías de evaluación del estatus hídrico vegetal es a través del análisis de la composición isotópica de carbono (C), que se expresa en términos de  $\delta^{13}\text{C}$  en unidades de partes por mil o ‰ (Werner *et al.*, 2012). La misma se basa en que cuando las plantas no tienen limitantes hídricas mantienen sus estomas abiertos, por lo cual la tasa de ingreso de  $\text{CO}_2$  a la planta será máxima. Bajo estas condiciones, el  $\text{CO}_2$  de la cavidad estomática estará enriquecido en  $^{12}\text{C}$  respecto al aire, ya que el isotópulo pesado ( $^{13}\text{CO}_2$ ) presenta una menor velocidad de difusión que el liviano ( $^{12}\text{CO}_2$ ) (Farquhar *et al.*, 1989). Además, durante la fotosíntesis de plantas C3 la enzima carboxilante RUBIS-

CO también discrimina en contra del isótopo pesado ( $^{13}\text{C}$ ). En cambio, cuando hay déficit hídrico los estomas se cierran, cesa el flujo de  $\text{CO}_2$  y la enzima RUBISCO utiliza una mayor proporción de  $^{13}\text{C}$  (Brüggemann *et al.*, 2011). Por lo tanto, las plantas C3 tienden a enriquecerse en  $^{13}\text{C}$  a medida que aumenta el nivel de déficit hídrico. Estas relaciones entre el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de la planta y su estatus hídrico han sido útiles para revelar los mecanismos que permiten a las distintas especies ajustar su metabolismo para competir mejor y sobrevivir en determinados ambientes (Ehleringer y Cooper, 1988; Ehleringer, 1993).

Otro índice isotópico estrechamente relacionado con el anterior es la discriminación isotópica de C ( $\Delta$ ), que indica el cambio de abundancia relativa de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) entre el sustrato y el producto. En este caso, el sustrato es el  $\text{CO}_2$  del aire y el producto es el fotosintato en el material vegetal. La ventaja de usar este índice con respecto al anterior, es que compensa por la diferencia de la composición de isótopos que pueda ocurrir en la fuente, como es el caso de la atmósfera en las últimas décadas. Este índice se relaciona con  $\delta^{13}\text{C}$  a través de la siguiente ecuación (Werner *et al.*, 2012):

$$\Delta = \frac{\delta_{\text{aire}} - \delta_{\text{planta}}}{1 + \delta_{\text{planta}}} \quad [1]$$

donde:

$\delta_{\text{aire}}$  y  $\delta_{\text{planta}}$  son la composición de  $^{13}\text{C}$  en valores  $\delta$  del aire y planta respectivamente.

Uno de los modelos más utilizados para describir el cambio de  $\Delta$  en función del fraccionamiento isotópico durante la fotosíntesis de especies C3 es el desarrollado por Farquhar *et al.* (1982). En su forma más simple se expresa como:

$$\Delta = a + (b-a)c/c_a \quad [2]$$

donde  $a$  es el fraccionamiento de C que ocurre durante la difusión de  $\text{CO}_2$  en el aire (4,4 ‰),  $b$  es el fraccionamiento neto causado durante la carboxilación, principalmente por la discriminación de la RUBISCO (aproximadamente 27 ‰), y  $c/c_a$  es la relación de presión parcial entre el  $\text{CO}_2$  intercelular y ambiental (Ehleringer, 1993). Al igual que para  $\delta^{13}\text{C}$ , existe una relación entre estatus hídrico y  $\Delta$ , pero en este caso la misma es positiva, ya que al aumentar la disponibilidad hídrica también aumenta la discriminación de la planta contra  $^{13}\text{CO}_2$ .

Con respecto a los métodos directos de evaluación del estatus hídrico, la composición de isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y la discriminación respecto a la atmósfera ( $\Delta$ )

tienen la ventaja de proporcionar un valor integrado en el tiempo. Ambos índices isotópicos varían en función de parámetros climáticos relacionados con el déficit hídrico. Por ejemplo, los incrementos de irradiancia (Brugnoli y Farquhar, 2000), temperatura del aire (Panek y Waring, 1995; Wang, 2003) y déficit de la presión de vapor atmosférico (Panek y Waring, 1997) influyen directamente en la dinámica de la conductancia foliar y conllevan a un incremento de  $\delta^{13}\text{C}$  y a una disminución de  $\Delta$  (Farquhar *et al.*, 1989). Asimismo, se ha documentado la existencia de una relación negativa entre  $\delta^{13}\text{C}$  foliar y la disponibilidad hídrica (Swap *et al.*, 2004). También se han establecido relaciones en gradientes de humedad del suelo desde sitios altos relativamente secos a sitios bajos relativamente húmedos (Ehleringer y Cooper, 1988).

Tal como lo predice la fórmula [1] se han encontrado relaciones lineales positivas entre  $\Delta$  y  $c/c_a$ , que se han verificado para escalas de tiempo que incluyen meses, semanas (Farquhar *et al.*, 1989) y minutos (Evans *et al.*, 1986). Esta relación lineal no se sostiene sin embargo, para grupos funcionales vegetales con baja conductancia del mesófilo (Barbour *et al.*, 2010). También se han encontrado relaciones positivas entre  $\Delta$  y otros indicadores de disponibilidad hídrica, como el nivel de disponibilidad de agua en el suelo (Tsialtas *et al.*, 2001).

Varios estudios han mostrado además una fuerte correlación entre la composición isotópica de C y la eficiencia de uso del agua (Farquhar *et al.*, 1989; Akhter y Monneveux, 2012) lo que ha llevado a la generalización, que en ocasiones no se cumple (Seibt *et al.*, 2008), de que las plantas más eficientes en el uso del agua deberían tener valores de  $\Delta$  menores. Estos procesos han sido estudiados en escalas que van desde el nivel de hoja hasta el de ecosistemas (Farquhar *et al.*, 1982; Schuster *et al.*, 1992; Tsialtas *et al.*, 2001; Ehleringer y Cook, 1998). La mayoría de los estudios en ecosistemas se han centrado en los forestales y desiertos y existe una carencia de información para las praderas (Chen *et al.*, 2007; Gómez-Guerrero *et al.*, 2013).

Uno de los pocos trabajos que reportan valores de  $\Delta$  en praderas mezcla es un estudio realizado por Caldeira *et al.* (2001); ellos reportaron que las especies que crecieron sin restricción hídrica en mezcla presentaron mayores  $\Delta$  que las mismas especies en monocultivo. Además sugirieron que en esas praderas mezcla habrían primado mecanismos sinérgicos de facilitación y complementación entre especies debido a que la mayor cobertura del suelo evitaría pérdidas de agua por evaporación y percolación.

A pesar de la importancia que tienen las pasturas mezcla en la producción agropecuaria de Uruguay, no hay suficiente información de cómo responden las especies integrantes de la misma al estrés hídrico. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar en una pastura mixta de gramíneas y leguminosas típica de la producción lechera de Uruguay a) el cambio durante un ciclo de crecimiento invierno-primaveral de  $\Delta$  y del estatus hídrico, y su relación con algunas variables climáticas; b) la modificación de estas tendencias cuando el trébol blanco crece sin competencia; y c) la evolución de la sobrevivencia y productividad de estas especies en la pradera mixta y pura. Nuestras hipótesis fueron (i) que la gramínea de la mezcla tendría valores de  $\Delta$  menores (menor discriminación de  $^{13}\text{C}$ ) y mejor estatus hídrico; y (ii) que existen diferencias en estos parámetros tanto entre las distintas leguminosas de la mezcla como entre trébol blanco puro y mezcla debido a las diferentes habilidades de estas especies y a la variabilidad de condiciones de competencia.

## Materiales y métodos

Este trabajo se realizó sobre una pradera sembrada en mayo de 2006 con una mezcla trébol blanco (*Trifolium repens*, L.), lotus (*Lotus corniculatus*, L.) y festuca (*Festuca arundinacea*, Schreb). El sitio estaba localizado en la zona sur de Uruguay (35° de latitud S) sobre un suelo que de acuerdo a la clasificación de los Estados Unidos es un Typic Argiudoll, y de acuerdo a la clasificación de Uruguay un Brunosol eútrico típico. Las mediciones se realizaron en 2007 en dos zonas contiguas entre sí: en la pradera mencionada, denominada pradera mezcla (PM), que mantenía las tres especies originalmente sembradas, y en otra zona aledaña, denominada pradera pura de trébol blanco (PP), que se encontraba dominada únicamente por esta especie. Los contenidos de C y N orgánico del suelo fueron de 25,0 y 26,3 g kg<sup>-1</sup>, y 2,3 y 2,2 g kg<sup>-1</sup>, para PM y PP, respectivamente.

Ambas praderas fueron manejadas bajo pastoreo rotativo y las cosechas de forraje (cortes) se realizaron antes del ingreso de los animales al área (cuando las plantas tenían una altura de entre 25 y 35 cm). Se realizaron cuatro cortes (30/8, 24/9, 19/10, 21/11) por zona; en cada cosecha se cortaron al azar cuatro áreas de 11,5 m<sup>2</sup> (1,15 m ancho\*10 m largo) a una altura de 5 cm del suelo. De cada área de corte se pesó el total de material fresco y luego de este se submuestreó de 1 a 1,5 kg para determinar el rendimiento de materia seca (MS). Las submuestras se seca-

ron a 60 °C hasta peso constante, previa separación de cada especie de la mezcla.

El estado hídrico de las plantas al momento de cada corte se estimó a través de su contenido de agua (CH) el cual se expresó como porcentaje del peso fresco (Chen *et al.* 2007):

$$CH = \left( \frac{P_{\text{fresco}} - P_{\text{seco}}}{P_{\text{fresco}}} \right) \times 100 \quad [3]$$

donde:

$P_{\text{fresco}}$  es el peso fresco y  $P_{\text{seco}}$  es el peso seco de la muestra en gramos.

Luego del secado las muestras fueron molidas primero utilizando un molino de cuchillas fijas y móviles (Marconi MA-580) y luego un molino rotatorio (SampleTek 200 vial Rotator). Cada muestra fue pesada en cápsulas de estaño e introducidas en un analizador elemental Flash EA 1112 acoplado a un espectrómetro de masa Thermo Finnigan DELTAplus (Bremen, Alemania), donde se determinó la abundancia natural de  $^{13}\text{C}$ . La precisión (desviación estándar) de la determinación fue de 0,3 ‰. La relación isotópica se expresó en notación delta ( $\delta$ ) en partes por mil o ‰:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right) \times 1000 \quad [4]$$

Para el cálculo de la  $\Delta$  en la ecuación [1] se usó un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  para el aire (sustrato) de -8 ‰.

Todas las mediciones isotópicas de  $^{13}\text{C}$  fueron con respecto al estándar PDB.

El déficit de vapor del aire atmosférico (DPV) se estimó como:

$$DPV = e_s - e_a \quad [5]$$

donde:

$e_s$  y  $e_a$  son las presiones de vapor de saturación y actual del aire, respectivamente.

A su vez,  $e_s$  se estimó con la fórmula de Tetens (1930)

$$e_s = 0,611 \cdot e^{\left( \frac{17,27 \cdot T}{237,3 + T} \right)} \quad [6]$$

donde:

$T$  es la temperatura media (°C) y  $e$  es la base del logaritmo natural (2,71828183), mientras que  $e_a$  se estimó a partir de la humedad relativa (HR) y  $e_s$  a través de la fórmula de Allen *et al.* (2006):

$$e_a = HR \cdot e_s / 100 \quad [7]$$

El porcentaje de agua disponible del suelo en las distintas fechas de muestreo se obtuvo de la estimación que realiza la Unidad GRAS del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay (INIA) en base a datos de balances hídricos de resolución 30 x 30 km (INIA, 2007).

### Análisis estadístico

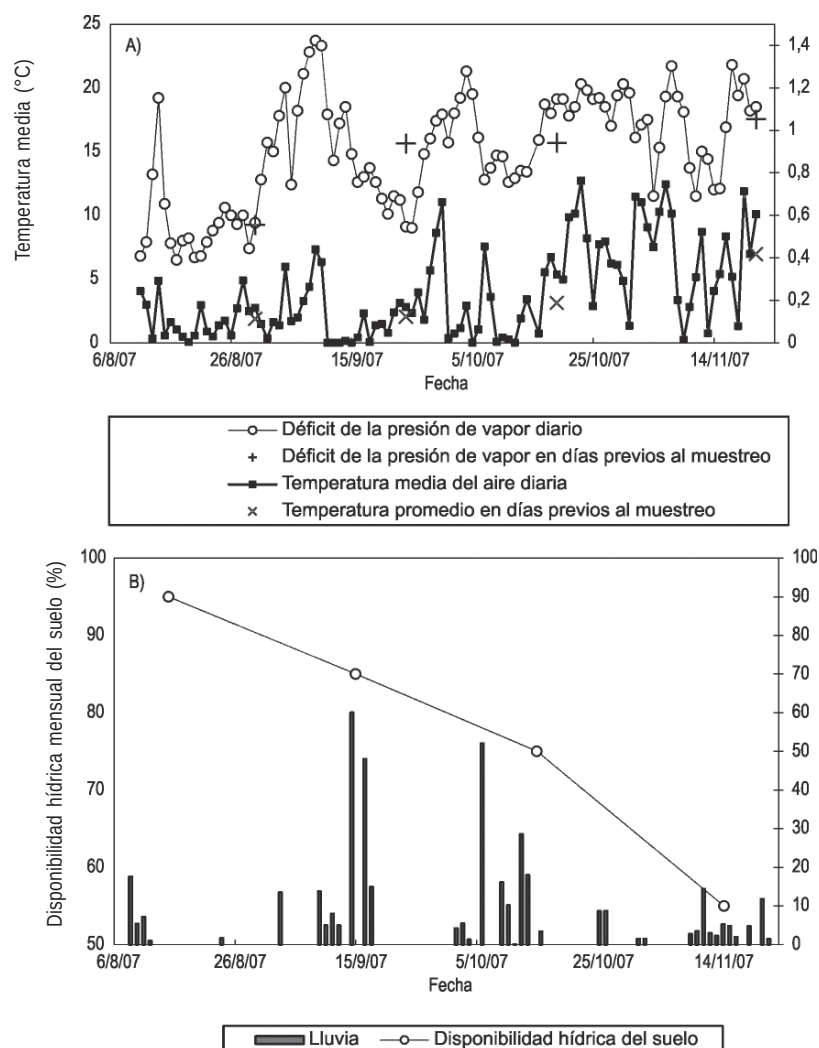
La existencia de diferencias de CH y  $\Delta$  entre especies dentro de PM se analizaron por ANOVA y comparación de medias por el Test de Tukey utilizando un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. Las comparaciones entre trébol blanco PP y PM para estos mismos parámetros se analizaron por el Test T de comparación de medias. Se ajustaron además modelos de regresión para describir la variación de CH y  $\Delta$  entre ellas y de cada una de estas con respecto al tiempo para cada especie. Para evaluar la existencia de diferencia de pendientes entre  $\Delta$  y tres variables climáticas (consideradas por separado) se utilizó un modelo ANCOVA, considerando Especie como variable clasificatoria y la variable climática como continua. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) utilizando los Procedimientos GLM y TTEST.

## Resultados

### Variaciones de contenido hídrico y discriminación isotópica de carbono

De acuerdo a lo esperado, los menores valores promedio de T y DPV se registraron en agosto previo al primer corte, mientras que los mayores ocurrieron en octubre-noviembre, previo a la última cosecha (Figura 1A). Por otra parte, los mayores niveles de lluvia se registraron en el período previo al segundo y tercer corte, en el mes de agosto (Figura 1B). De acuerdo con esto, la disponibilidad hídrica en el suelo fue máxima en invierno y luego decreció durante el resto del período (Figura 1B), con valores máximos y mínimos de 95 y 55 %, respectivamente.

La evolución de CH y  $\Delta$  de todas las especies en la mezcla reflejó los cambios climáticos, ya que como muestran los modelos de regresión cuadrática ajustados (Figuras 2 y 3), ambos parámetros tendieron a incrementarse entre el primer y segundo corte, y luego decrecieron. Los máximos valores de CH se alcanzaron el 3 de octubre para trébol blanco mezcla y puro, y el 14 de octubre para festuca. La excepción de esta tendencia fue el lotus, que tuvo los mayores valores en el último corte, en el mes de noviembre. En cambio, los valores de  $\Delta$  estuvieron de acuerdo a



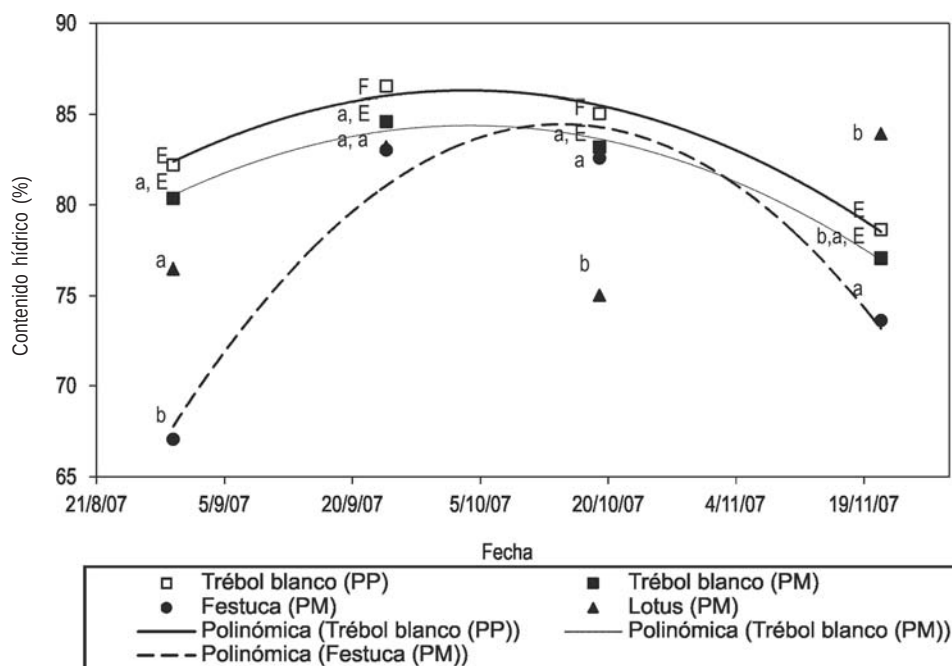
**Figura 1.** Evolución de las variables climáticas para el sitio y período de estudio. En A se indican los valores de déficit de presión de vapor atmosférico diario y la temperatura media del aire diaria. En B se representan los valores de precipitación diaria y la disponibilidad hídrica mensual del suelo.

lo esperado en todos los casos alcanzándose los máximos valores el 22 y 29 de setiembre para trébol blanco mezcla y puro respectivamente, el 30 de setiembre para lotus y el 2 de octubre para festuca.

La mayor disminución de CH entre el segundo y cuarto corte se registró en festuca y casi no varió en lotus (Figura 2), mientras que en ese período las mayores disminuciones de  $\Delta$  también ocurrieron en festuca y a diferencia de CH en lotus (Figura 3). La caída de trébol blanco en ambos parámetros fue menos marcada.

Los resultados de los análisis de varianza (ANOVA) dentro de cada corte en la mezcla revelaron que aunque los valores de CH tendieron a ser mayores en trébol blanco que en festuca, no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 2). Las posiciones relativas de lotus mostraron un comportamiento errático fluctuando entre cortes. En el caso de  $\Delta$ , en cambio, los mayores valores fueron para lotus (Figura 3), mientras que en trébol blanco PM esta variable fue significativamente inferior a festuca en los dos primeros cortes de primavera y similar a esta gramínea en el primer (invierno) y último corte.





**Figura 2.** Evolución del contenido hídrico (CH) en el período de evaluación para diferentes especies de leguminosas y gramíneas. Las relaciones entre CH y fecha fueron:  $y = -0,008x^2 + 633,64x - 1 \times 10^7$  ( $R^2 = 0,7504$ ) para festuca;  $y = -0,0032x^2 + 251,92x - 5 \times 10^6$  ( $R^2 = 0,9558$ ) para trébol blanco (TB) en la pradera mezcla (PM) e  $y = -0,008x^2 + 633,64x + 1 \times 10^7$  ( $R^2 = 0,7504$ ) para TB en la pastura pura (PP). Todos los coeficientes lineales y cuadráticos de las ecuaciones incluidas en la figura fueron significativos a  $P < 0,0001$ . En el caso de lotus no se encontró una ecuación de regresión que describiera los cambios de CH con respecto al tiempo. Para una misma fecha, medias con una letra minúscula común no fueron significativamente diferentes de acuerdo al Test de Tukey ( $P < 0,05$ ), medias con una letra mayúscula común no fueron significativamente diferentes de acuerdo al Test T de comparación de medias ( $P < 0,05$ ). El Test de Tukey se utilizó para comparar especies dentro de PM mientras que el Test T fue usado para comparar TB en PM y PP.

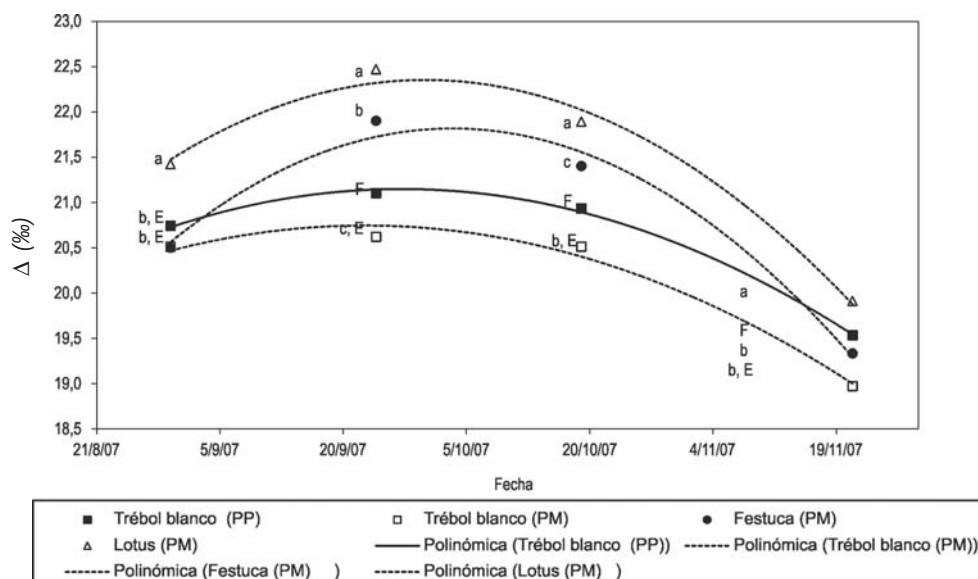
Dentro de trébol blanco (PP vs PM) existieron diferencias estadísticamente significativas de CH en el segundo y tercer corte (Figura 2), pese a que los valores de CH en PP fueron superiores en todos los muestreos. Existieron, también, diferencias estadísticamente significativas de  $\Delta$  entre trébol blanco PP y PM, siendo los valores mayores en PP (Figura 3). La excepción fue el primer muestreo, cuando la demanda atmosférica fue baja. En esta especie, considerando en forma conjunta PP y PM durante todo el período de evaluación, existió una relación lineal significativa entre  $\Delta$  y CH. Cuando se analizó esta relación por separado para distintos períodos, se observó que la misma fue lineal sólo en los tres cortes de primavera (Figuras 4 A y B) pero no lo fue en invierno. Algo similar ocurrió en festuca, aunque los valores de  $\Delta$  de trébol blanco fueron inferiores a los de festuca para iguales valores de CH. En lotus, en cambio,

estas variables no se correlacionaron linealmente en ningún corte.

### Relaciones entre variables climáticas y $\Delta$

Se encontró una fuerte relación lineal negativa entre  $\Delta$  y DPV para todas las especies (Cuadro 1). El ANCOVA evidenció que la pendiente de esta relación no difirió significativamente entre especies sino que estas funciones sólo se diferenciaron en el intercepto. Por lo tanto, todas las especies mostraron incrementos similares de  $\Delta$  ante el descenso de DPV.

Existió también en todas las especies evaluadas una relación cuadrática entre  $\Delta$  y T media (Cuadro 1), aunque esta relación sólo fue estadísticamente significativa en trébol blanco PP y PM, donde además estas relaciones fueron muy similares, difiriendo levemente sólo en el intercepto. En



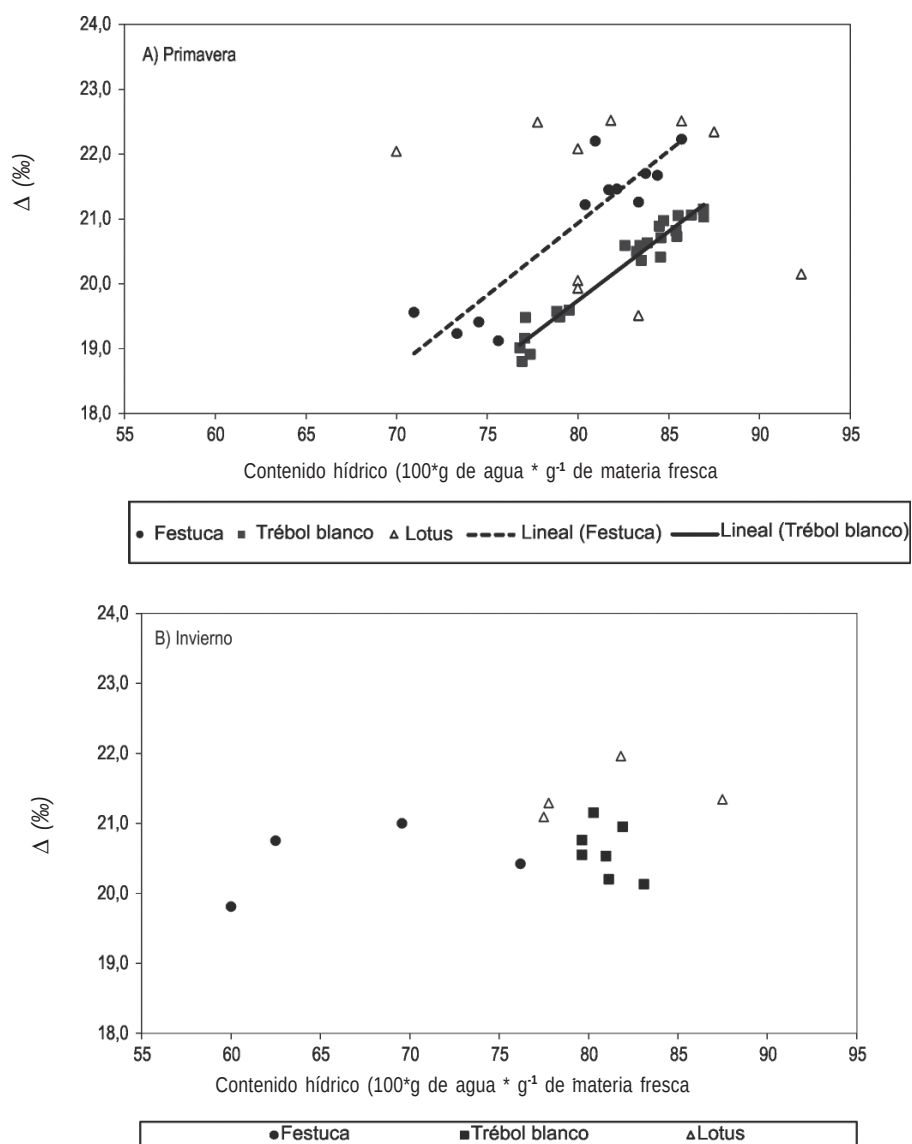
**Figura 3.** Evolución de la discriminación isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta$ ) en el período de evaluación para diferentes especies de leguminosas y gramíneas. Las relaciones entre  $\Delta$  y fecha fueron:  $y = -0,0011x^2 + 84,015x + 2 \times 10^6$  ( $R^2 = 0,8978$ ) para festuca;  $y = 0,001x^2 + 78,178x - 2 \times 10^6$  ( $R^2 = 0,9525$ ) para lotus;  $y = -0,0005x^2 + 39,057x - 768,374$  ( $R^2 = 0,9424$ ) para trébol blanco (TB) en la pradera mezcla (PM) y  $y = -0,0005x^2 + 41,938x + 825,158$  ( $R^2 = 0,9029$ ) para TB en la pastura pura (PP). Todos los coeficientes lineales y cuadráticos de las ecuaciones incluidas en la figura fueron significativos a  $P < 0,01$ . Para una misma fecha, medias con una letra minúscula común no fueron significativamente diferentes de acuerdo al Test de Tukey ( $P < 0,05$ ), medias con una letra mayúscula común no fueron significativamente diferentes de acuerdo al Test T de comparación de medias ( $P < 0,05$ ). El Test de Tukey se utilizó para comparar especies dentro de PM mientras que el Test T fue usado para comparar TB en PM y PP.

las otras dos especies, en cambio, las diferencias en el intercepto fueron mayores. Por derivación se determinó que para festuca y lotus la máxima  $\Delta$  ocurrió a temperaturas de  $12,7^\circ\text{C}$ , mientras que para trébol blanco en PP y PM este máximo se dio a  $13,3$  y  $12,0^\circ\text{C}$ . Por lo tanto, la máxima  $\Delta$  ocurriría a una temperatura muy similar entre especies, aunque este dato debe considerarse con cautela debido a que en ese rango no existieron observaciones. En primavera, en cambio, se observó una relación lineal negativa entre  $\Delta$  y  $T$  media (Cuadro 1), la cual fue significativa para todas las especies. El valor de  $\Delta$  se correlacionó positivamente con las lluvias en las tres especies; esto era esperado, ya que al aumentar la disponibilidad hídrica se incrementa la conductancia estomática (Cuadro 1).

### Evolución de la materia seca

El rendimiento de MS de trébol blanco en PM y PP fue similar en los tres primeros cortes, pero el de PM fue inferior en el cuarto corte (Figura 3). Esto se debió a que el rendimiento de esta especie se incrementó a medida que se sucedieron los tres primeros cortes tanto en PP como en PM, mientras que en el cuarto corte el rendimiento decreció solo en PM pero continuó ascendiendo en PP.

En PM la evolución del rendimiento de festuca fue similar al de trébol blanco pero su contribución al rendimiento total fue muy inferior, excepto en el último corte donde festuca y trébol blanco contribuyeron de modo similar. Durante el período analizado, lotus mostró poco cambio de productividad y su contribución al rendimiento de la mezcla fue muy baja.



**Figura 4.** Relación entre contenido hídrico (CH) y discriminación isotópica de  $^{13}C$  ( $\Delta$ ) para diferentes especies de leguminosas y gramíneas en primavera (A) y en invierno (B). La relación entre  $\Delta$  y CH para trébol blanco fue  $y = 0,215x + 0,558$  ( $P < 0,007$ ) mientras que para festuca fue  $y = 0,222x + 3,132$  ( $P < 0,001$ ). No se encontraron relaciones entre estas variables para lotus en primavera ni para ninguna especie en invierno.

## Discusión

La variación de CH y  $\Delta$  en todas las especies, tanto en PP como en PM, fue la esperable ante cambios de disponibilidad hídrica (Figuras 2 y 3). Cuando la disponibilidad de agua disminuyó (Figura 1B), CH y  $\Delta$  tendieron a decrecer. Generalmente, la competencia entre plantas vecinas incrementa esta caída de CH y  $\Delta$  (Smedley *et al.*, 1991). Algu-

nos de los procesos que pueden originar la disminución de  $\Delta$  son la disminución de la conductancia estomática de  $CO_2$  (Caldeira *et al.*, 2001), de la conductancia del mesófilo (Seibt *et al.*, 2008) o de la tasa fotosintética (Smedley *et al.*, 1991). En este estudio parece más probable que el primer proceso fuera la causa del descenso de  $\Delta$  en ambas praderas, ya que la concentración de N de las especies estudiadas no varió (datos no mostrados) por lo cual la tasa



**Cuadro 1.** Ecuaciones de regresión encontradas entre discriminación isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta$ ) y tres variables climáticas independientes consideradas por separado. Estas variables fueron el déficit de la presión de vapor (DPV), la temperatura media (T media) y la lluvia. Las regresiones se estimaron para tres especies forrajeras; una de ellas (trébol blanco) en cultivo puro (PP) y mezcla (PM) y las otras dos (lotus y festuca) solo en la pastura mezcla (PM). Estas relaciones fueron estimadas para todo el periodo de evaluación (agosto a noviembre).

| Especie y pastura                           | DPV (kPa)            |         | T media (° C)                 |                 | Lluvia (mm)         |         |
|---------------------------------------------|----------------------|---------|-------------------------------|-----------------|---------------------|---------|
|                                             | Ecuación             | $R^2$   | Ecuación                      | $R^2$           | Ecuación            | $R^2$   |
| <b>Todo el periodo (agosto a noviembre)</b> |                      |         |                               |                 |                     |         |
| Trébol blanco (PP)                          | $y = -3,01x + 21,43$ | 0,80    | $y = -0,09x^2 + 2,34x + 7,52$ | 0,90            | $y = 0,01x + 19,50$ | 0,57    |
| Trébol blanco (PM)                          | $y = -3,46x + 21,14$ | 0,91    | $y = -0,10x^2 + 2,37x + 7,17$ | 0,96            | $y = 0,01x + 19,12$ | 0,45    |
| Festuca (PM)                                | $y = -4,03x + 21,93$ | 0,58    | NS <sup>5</sup>               | NC <sup>6</sup> | $y = 0,02x + 18,74$ | 0,82    |
| Lotus (PM)                                  | $y = -4,34x + 22,64$ | 0,75    | NS                            | NC              | $y = 0,02x + 19,56$ | 0,75    |
| <b>Ancova<sup>1</sup></b>                   |                      |         |                               |                 |                     |         |
|                                             | Fuente de V (GL)     | P       |                               |                 | F de V (GL)         | P       |
|                                             | DPV <sup>2</sup>     | <0,0001 |                               |                 | Lluvia              | <0,0001 |
|                                             | especie              | <0,0001 | NC <sup>3</sup>               |                 | especie             | <0,0001 |
|                                             | DPV*especie          | NS      |                               |                 | Lluvia *especie     | 0,019   |
| <b>Primavera (setiembre a noviembre)</b>    |                      |         |                               |                 |                     |         |
| Trébol blanco (PP)                          | $y = -3,54x + 21,71$ | 0,98    | $y = -0,79x + 33,36$          | 0,99            | $y = 0,01x + 18,84$ | 0,97    |
| Trébol blanco (PM)                          | $y = -3,76x + 21,30$ | 0,95    | $y = -0,85x + 33,81$          | 0,97            | $y = 0,01x + 18,24$ | 0,94    |
| Festuca (PM)                                | $y = -5,63x + 22,77$ | 0,95    | $y = -1,23x - 40,98$          | 0,93            | $y = 0,02x + 18,20$ | 0,95    |
| Lotus (PM)                                  | $y = -5,62x + 23,35$ | 0,98    | $y = -1,28x + 42,35$          | 0,97            | $y = 0,02x + 18,78$ | 0,98    |
| <b>Ancova<sup>1</sup></b>                   |                      |         |                               |                 |                     |         |
|                                             | Fuente de V          | P       | Fuente de V                   | P               | F de V              | P       |
|                                             | DPV                  | <0,0001 | T media                       | <0,0001         | Lluvia              | <0,0001 |
|                                             | especie              | <0,0001 | especie                       | <0,0001         | especie             | 0,006   |
|                                             | DPV*especie          | <0,0001 | DPV*especie                   | <0,0001         | Lluvia *especie     | <0,0001 |

fotosintética no habría sido afectada, aunque tampoco se puede descartar una disminución en la conductancia del mesófilo. De todas formas, independientemente del mecanismo involucrado, la información aportada por la variación de  $\Delta$  reveló que el patrón de uso de agua de todas estas especies se volvió más conservador a causa de la disminución del agua en el suelo y del aumento de la demanda evaporativa (Figura 1).

Dentro de PM el orden observado de  $\Delta$  reflejó el estatus hídrico esperado de especies forrajeras en situación de competencia, ya que en los dos primeros cortes de primavera (cortes 2 y 3) los valores de festuca fueron superiores a los de trébol blanco, posiblemente la especie más sensible a la sequía (Figura 3). Es posible que en el primer corte esas diferencias de  $\Delta$  no se hubieran expresado porque no existieron condiciones de deficiencia hídrica, mientras que en el último corte esta deficiencia pudo haber sido tan grande que incluso las plantas de festuca se vieron forzadas a

reducir su conductancia estomática. La excepción fue lotus, que no varió significativamente sus valores de  $\Delta$  durante el periodo de estudio, y presentó en el último corte los mayores valores de este parámetro, aunque es posible que la muy baja proporción de esta leguminosa en la mezcla (entre 6,2 y 0,3 %) haya influido en los resultados.

Pese a que tanto festuca como trébol blanco disminuyeron su conductancia estomática durante el periodo de mayor estrés hídrico (octubre y noviembre), igualmente no lograron evitar pérdidas de agua (Figuras 2 y 3). Lotus en cambio demostró tener mayor tolerancia al estrés hídrico, ya que la disminución de  $\Delta$  en esta especie no estuvo acompañada por cambios de CH, lo cual sugiere que fue más efectiva en la regulación de cierre estomático. Nuestros resultados son compatibles además con los obtenidos por Signorelli et al. (2013), quienes al aplicar un estrés hídrico severo observaron que trébol blanco disminuyó más tempranamente la conductancia estomática que lotus, mientras

que las pérdidas de agua se registraron más tardíamente en lotus que en trébol blanco. Además encontraron que la conductancia estomática basal fue significativamente mayor en trébol blanco que en lotus.

Por otro lado las diferencias de  $\Delta$  en trébol blanco PP y PM estarían indicando la existencia de fenómenos de competencia interespecífica por agua disponible en el suelo en la pastura mezcla (Smedley *et al.*, 1991), que limitaron su disponibilidad hídrica y causaron un déficit hídrico adelantado en PM con respecto a PP. En el único corte en que no existió diferencia significativa de  $\Delta$  entre esta misma especie con y sin competencia interespecífica fue en el primero, cuando la disponibilidad hídrica fue máxima y la demanda atmosférica fue mínima (Figura 1). Por tanto, las diferencias de  $\Delta$  entre trébol blanco PP y PM observadas en este experimento fueron causadas por diferentes disponibilidades hídricas, lo cual determinó a su vez diferencias en la EUA de esta especie en PM y PP (Høgh-Jensen y Schjoerring, 1997). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros investigadores (Ma *et al.*, 2012) en cuanto a que los valores de  $\Delta$  de las hojas de plantas que forman parte de una comunidad son indicadores de su disponibilidad hídrica, incluso para intervalos de tiempo como los de este experimento (Ehleringer y Cooper, 1988). En nuestro caso el parámetro isotópico  $\Delta$  permitió diferenciar, excepto en el muestreo de invierno, entre el estatus hídrico de trébol blanco en PP y PM, lo que no fue posible usando el CH (Figura 3). Sin embargo, Caldeira *et al.* (2001) encontraron mayores valores de  $\Delta$  cuando las especies crecían en mezcla que en praderas puras, pero esta discrepancia se debió a que en ese estudio se trabajó sin deficiencia hídrica y además las especies y clima fueron diferentes.

A diferencia de lo observado para  $\Delta$ , CH no permitió diferenciar entre el estatus hídrico de trébol blanco creciendo en PP y PM en todo el período de primavera. Para trébol blanco y festuca en primavera, en cambio, existió una relación positiva entre estos parámetros, es decir, a mayor CH mayor discriminación de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4A) lo que sugiere que ambas variables guardan una relación similar con el estatus hídrico. La existencia de relaciones entre estas variables también ha sido reportado por otros autores (Chen *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2012). Además, se han reportado buenas relaciones entre  $\Delta$  y otros índices de estado hídrico vegetal, como el potencial hídrico foliar o de tallo (Santesteban *et al.*, 2012), o el contenido relativo de agua foliar (de Souza *et al.*, 2005). Estas relaciones refuerzan aún más la hipótesis de que  $\Delta$  es un buen indicador del estatus hídrico de la planta.

Las relaciones encontradas entre  $\Delta$  y varias variables climáticas (déficit de la presión de vapor, temperatura media y lluvia) fueron superiores cuando se consideró sólo el período de primavera (Cuadro 1), lo cual sugiere que durante el invierno la disponibilidad hídrica (Figura 1B) no fue limitante para el crecimiento del cultivo debido en parte a la baja demanda atmosférica. Esto habría determinado la ocurrencia de altos valores de  $c/c_a$  y por ende, una baja actividad fotosintética durante ese período. La correlación negativa encontrada entre  $\Delta$  y el déficit de la presión de vapor (DPV) tanto en todo el período como en primavera concuerda con el hecho de que a mayor DPV se reduce la conductancia estomática (Oren *et al.*, 1999) y la relación  $c/c_a$  (Panek y Waring, 1997) provocando que  $\Delta$  descienda (Farquhar *et al.*, 1989; Ehleringer, 1993; Barbour y Farquhar, 2000).

La tendencia cuadrática observada en invierno entre  $\Delta$  y temperatura media (Cuadro 1) es similar a la encontrada entre fotosíntesis y temperatura cuando este proceso está limitado por la Rubisco (Bernacchi *et al.*, 2009), aunque las temperaturas a las que se maximizó  $\Delta$  (12,6 °C, en promedio para estas especies) fueron inferiores a las reportadas para maximizar la fotosíntesis (aproximadamente 25 °C). Este mismo tipo de relación entre  $\Delta$  y temperatura fue reportada por Wang (2003) para otras especies como *Bothriochloa ischaemum*, *Lespedeza davurica* y *Artemisia gmelinii*. El mecanismo podría estar vinculado con la reducción de la conductancia estomática que se produce cuando la temperatura foliar aumenta por encima del óptimo (Panek y Waring, 1995), aunque la temperatura tiene además otros efectos directos en el pH de las hojas y en la actividad de numerosas enzimas incluyendo la Rubisco (Bernacchi *et al.*, 2009) que también provocarían cambios en  $\Delta$  tanto por debajo como por encima del óptimo.

Por otro lado, la correlación lineal positiva entre  $\Delta$  y lluvias sustenta las conclusiones de otros investigadores (Murphy y Bowman, 2009; Ma *et al.*, 2012) de que las restricciones hídricas provocan disminuciones tanto en la conductancia estomática como en la capacidad fotosintética (Hartman y Danin, 2010).

La caída de rendimiento de trébol blanco en PM en el último corte podría explicarse por la mayor limitación hídrica (Høgh-Jensen y Schjoerring, 1997; Lucero *et al.*, 2000) y por la competencia interespecífica (Suriyagoda *et al.*, 2011), que determinó una disminución de la tasa fotosintética y/o la conductancia estomática con respecto a la misma especie que creció en monocultivo (Figura 5). Esta problemática de competencia interespecífica entre gramíneas y leguminosas es conocida a nivel agronómico en Uruguay, por lo que

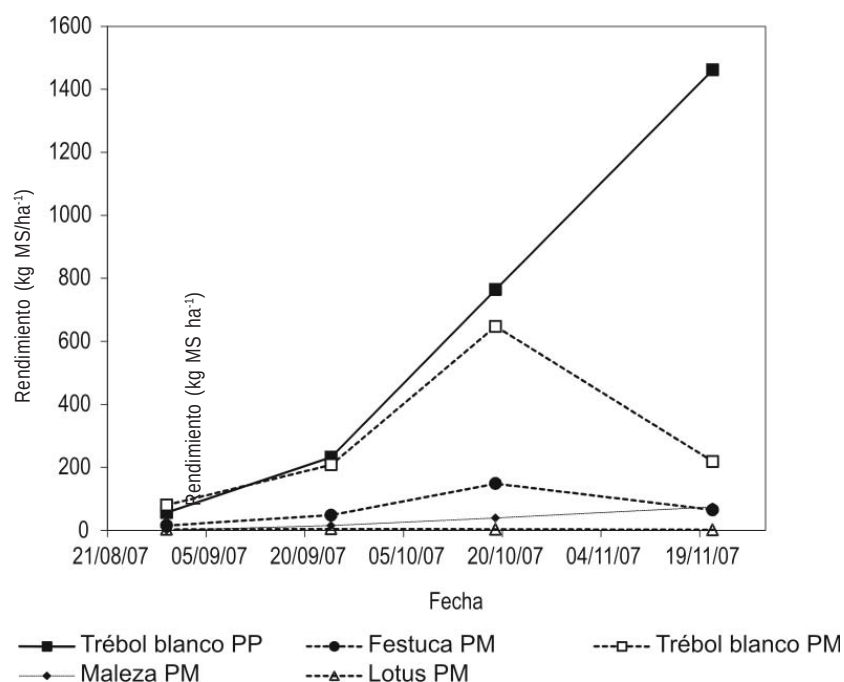
se aconseja limitar la densidad de siembra de gramíneas para no afectar la persistencia de las leguminosas (Formoso, 2012).

En este trabajo no se encontraron relaciones entre  $\Delta$  y el rendimiento de MS de cada corte, ni tampoco durante todo el período de estudio. Otros autores han reportado la existencia de relaciones significativas entre estas variables, pero solo en cultivos puros sin competencia interespecífica. Las mismas han sido tanto negativas (Barbour *et al.*, 1996; Lucero *et al.* 2000) como positivas (Wright *et al.*, 1993; Johnson y Tieszen, 1993). Es de esperar que estas relaciones también existan dentro de praderas mezcla, pero van a estar influidas no solo por el estatus hídrico del suelo sino también por el grado de competencia por este recurso entre especies.

Estos resultados indican que, contrariamente a lo postulado en nuestra hipótesis de trabajo la festuca de la mezcla no tuvo valores menores de  $\Delta$  ni contenidos hídricos mayores que las leguminosas, pese a su supuesto mayor control de cierre estomático y a su mayor capacidad de absorber agua del suelo. En cambio, si se verificaron dife-

rencias entre trébol blanco puro y mezcla debido a la competencia con las demás especies de la pradera mixta por agua.

En conclusión, los cambios de  $\Delta$  y CH de especies de pasturas mezclas reflejaron cambios de disponibilidad hídrica debido tanto a variaciones climáticas estacionales o eventuales como a variaciones de competencia interespecífica por agua, como se puede apreciar al comparar la evolución diferencial de  $\Delta$  y CH en trébol blanco en PP y PM. Esta diferencia se asoció a su vez a diferencias de sobrevivencia y productividad entre estas dos pasturas de trébol blanco, favoreciendo a esta especie en PP que obviamente no sufrió competitividad por agua por las otras especies de la pastura. La ventaja de utilizar  $\Delta$  en lugar de CH radica en la mayor sensibilidad del primero, el cual permite integrar el estatus hídrico de las especies en el tiempo. Por tanto, el uso de este indicador isotópico puede permitir detectar efectos de cambios de manejo de pasturas en la disponibilidad hídrica de las mismas o diferencias de adaptación de variedades de una misma especie en situación de competencia.



**Figura 5.** Evolución del rendimiento de materia seca de tres especies forrajeras, una de ellas (trébol blanco) en cultivo puro (PP) o en mezcla (PM) con las dos especies restantes (lotus y festuca) en cuatro fechas de muestreo.

## Agradecimientos

A los profesores Dr. Jorge Franco, titular del Departamento de Biometría, Estadística y Computación, y Dra. Mónica Barbazán, del Departamento Suelos y Aguas de la Facultad de Agronomía de la Udelar, por los aportes realizados a este trabajo. A la Dra. María Elena Fernández del CONICET-INTA (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de Balcarce Argentina por la revisión crítica del manuscrito.

## Bibliografía

- Akhter J, Monneveux P.** 2012. Crop Productivity and water use efficiency : the role of carbon isotope discrimination technique. En: Crop Ashraf M, Öztürk M, Ahmad MSA, Aksoy, A. [Eds.]. *Production for Agricultural Improvement*. Netherlands: Springer. pp. 395-416.
- Allen R, Pereira L, Raes D, Smith M.** 2006. Evapotranspiración del cultivo : Guías para la determinación de los requerimientos de agua en los cultivos. Roma: FAO. 298p. (Riego y drenaje ; 56).
- Barbour MM, Farquhar GD.** 2000. Relative humidity- and ABA-induced variation in carbon and oxygen isotope ratios of cotton leaves. *Plant, Cell and Environment*, 23: 473-485.
- Barbour MM, Warren CR, Farquhar GD, Forrester G, Brown H.** 2010. Variability in mesophyll conductance between barley genotypes, and effects on transpiration efficiency and carbon isotope discrimination. *Plant, Cell and Environment*, 33: 1173-1185.
- Barbour MM, Caradus JR, Woodfield DR, Silvester WB.** 1996. Water stress and water use efficiency of ten white clover cultivars. En: Woodfield [Ed.]. *White Clover : New Zealand's competitive edge*. Christchurch: Lincoln University. pp. 159-162.
- Bernacchi CJ, Rosenthal DM, Pimentel C, Long SP, Farquhar GD.** 2009. Modeling the Temperature Dependence of C3 Photosynthesis. En: Laik A, Nedbal L, Govindjee, G [Eds.]. *Photosynthesis in silico: Understanding Complexity from Molecules to Ecosystems*. Dordrecht : Springer (Advances in Photosynthesis and Respiration Series). pp. 231-246.
- Brüggemann N, Gessler A, Kayler Z, Keel SG, Badeck F, Barthel M, Boeckx P, Buchmann N, Brugnoli E, Esperschütz J, Gavrichkova O, Ghashghaie J, Gomez-Casanovas N, Keitel C, Knohl A, Kuptz D, Palacio S, Salmon Y, Uchida Y, Bahn M.** 2011. Carbon allocation and carbon isotope fluxes in the plant-soil-atmosphere continuum: a review. *Biogeosciences*, 8: 3457-3489.
- Brugnoli E, Farquhar GD.** 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. En: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S. [Eds.]. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic. (Advances in photosynthesis). pp. 399-434.
- Caldeira MC, Ryel RJ, Lawton JH, Pereira JS.** 2001. Mechanisms of positive biodiversity production relationships: insights provided by  $\delta^{13}\text{C}$  analysis in experimental Mediterranean grassland plots. *Ecology Letters*, 4: 439-443.
- Chen S, Bai Y, Lin G, Huang X, Han X.** 2007. Variations in  $\delta^{13}\text{C}$  values among major plant community types in the Xilin River Basin, Inner Mongolia, China. *Australian Journal of Botany*, 55: 48-54.
- Connolly J, Finn JA, Black AD, Kirwan L, Brophy C, Lüscher A.** 2009. Effects of multi-species swards on dry matter production and the incidence of unsown species at three Irish sites. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 48: 243-260.
- de Souza CR, Maroco JP, Dos Santos TP, Rodrigues ML, Lopes C, Pereira JS, Chaves MM.** 2005. Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 261-274.
- Ehleringer JR.** 1993. Gas exchange implications of isotopic variation in arid land plants. En: Smith JAC, Griffiths H. [Eds.]. *Water Deficits : Plant Responses From Cell To Community*. Oxford: BIOS Scientific. pp. 265-284.
- Ehleringer JR, Cook CS.** 1998. Carbon and oxygen isotope ratio of ecosystem respiration along an Oregon conifer transect: preliminary observations based on small-flask sampling. *Tree Physiology*, 18: 513-519.
- Ehleringer JR, Cooper TA.** 1988. Correlations between carbon isotope ratio and microhabitat in desert plants. *Oecologia*, 76: 562-566.
- Evans JR, Sharkey TD, Berry JA, Farquhar GD.** 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate  $\text{CO}_2$  diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 281-292.
- Farquhar GD, Sharkey TD.** 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 33: 317-345.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT.** 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 503-537.
- Formoso F.** 2012. Mezclas forrajeras raigrás más leguminosas: ventajas y limitantes. *Revista INIA Uruguay*, 28: 34-43.
- Gómez-Guerrero A, Silva LCR, Barrera-Reyes M, Kishchuk B, Velázquez-Martínez A, Martínez-Trinidad T, Plascencia-Escalante FO, Horwath WR.** 2013. Growth decline and divergent tree ring isotopic composition ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ ) contradict predictions of  $\text{CO}_2$  stimulation in high altitudinal forests. *Global Change Biology*, 19: 1748-1758.
- Hartman G, Danin A.** 2010. Isotopic values of plants in relation to water availability in the Eastern Mediterranean region. *Oecologia*, 162: 837-852.
- Højh-Jensen H, Schjoerring JK.** 1997. Effects of drought and inorganic N form on nitrogen fixation and carbon isotope discrimination in white clover. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35: 55-62.
- INIA.** 2007. Estado de algunas variables agro-climáticas y perspectivas climáticas para el segundo y tercer trimestre del año 2007 [En línea]. Consultado 20 de agosto 2013. Disponible en: [http://www.inia.org.uy/gras/inf\\_agroclim/](http://www.inia.org.uy/gras/inf_agroclim/)
- Johnson RC, Tieszen LL.** 1993. Carbon isotope discrimination, water relations, and gas exchange in temperate grass species and accessions. En: Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD [Eds.]. *Stable Isotopes and Plant Water Relations*. San Diego: Academic Press. pp. 281-296.
- Kramer PJ.** 1983. Water deficits and plant growth. En: Boyer J, Kramer P [Ed.]. *Water relations of plants*. New York : Academic Press. pp. 342-389.
- Kramer PJ, Boyer JS.** 1995. Roots and Root Systems. En: Boyer J, Kramer P. [Eds.]. *Water Relations of Plants and Soils*. San Diego: Academic Press. pp. 115-121.
- Lazaridou M, Kostopoulou P, Karatassiou M, Merkouropoulos G.** 2013. Comparative investigation of physiological responses of field-grown Comparative investigation of physiological responses of field-grown. *African Journal of Range and Forage Science*, 29: 147-152.
- Lucero DW, Grieu P, Guckert A.** 2000. Water deficit and plant competition effects on growth and water-use efficiency of white clover (*Trifolium repens* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Soil*, 227: 1-15.

- Ma JY, Sun W, Sun H, Wang SM.** 2012. Stable carbon isotope characteristics of desert plants in the Junggar Basin, China. *Ecological Research*, 27: 115-124.
- Mallarino AP, Wedin WF, Perdomo CH, Goyenola RS, West CP.** 1990. Nitrogen transfer from white clover, red clover, and birdsfoot trefoil to associated grass. *Agronomy Journal*, 82: 790-795.
- Marriott CA.** 1988. Seasonal variation in white clover content and nitrogen fixing (acetylene reducing) activity in a cut upland sward. *Grass and Forage Science*, 43: 253-262.
- Murphy BP, Bowman DM.** 2009. The carbon and nitrogen isotope composition of Australian grasses in relation to climate. *Functional Ecology*, 23: 1040-1049.
- Oren R, Sperry JS, Katul GG, Pataki DE, Ewers BE, Phillips N, Schäfer KVR.** 1999. Survey and synthesis of intra and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant, Cell and Environment*, 22: 1515-1526.
- Panek JA, Waring RH.** 1997. Stable carbon isotopes as indicators of limitation to forest growth imposed by climate stress. *Ecological Applications*, 7: 854-863.
- Panek JA, Waring RH.** 1995. Carbon isotope variation in Douglas-fir foliage: improving the  $\delta^{13}\text{C}$  climate relationship. *Tree Physiology*, 15: 657-663.
- Rebuffo M, Bemhaja M, Risso D.** 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newsletter*, 36: 22-33.
- Sanderson MA, Soder KJ, Muller LD, Klement K.D, Skinner RH, Goslee SC.** 2005. Forage mixture productivity and botanical composition in pastures grazed by dairy cattle. *Agronomy Journal*, 97: 1465-1471.
- Santesteban LG, Miranda C, Urretavizcaya I, Royo JB.** 2012. Carbon isotope ratio of whole berries as an estimator of plant water status in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. 'Tempranillo'. *Scientia Horticulturae*, 146: 7-13.
- Schuster WSF, Sandquist DR, Phillips SL, Ehleringer JR.** 1992. Comparisons of carbon isotope discrimination in populations of arid land plant species differing in lifespan. *Oecologia*, 91: 332-337.
- Seibt U, Rajabi A, Griffiths H, Berry J.** 2008. Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia*, 155: 441-454.
- Signorelli S, Casaretto E, Sainz MM, Díaz P, Monza J, Borsani O.** 2013. Antioxidant and photosystem II responses explain the drought-heat contrasting tolerance of two forage legumes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 195-203.
- Smedley MP, Dawson TE, Comstock JP, Donovan LA, Sherrill DE, Cook CS, Ehleringer JR.** 1991. Seasonal carbon isotopic discrimination in a grassland community. *Oecologia*, 85: 314-320.
- Suriyagoda LDB, Megan HR, Renton M, Lambers H.** 2011. Above-and below-ground interactions of grass and pasture legume species when grown together under drought and low phosphorus availability. *Plant Soil*, 348: 281-297.
- Swap RJ, Aranibar JN, Dowty PR, Gilhooly WP, Macko SA.** 2004. Natural abundance of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  vegetation of southern Africa: patterns and implications. *Global Change Biology*, 10: 350-358.
- Tetens O.** 1930. Über einige meteorologische Begriffe. *Zeitschrift für Geophysik*, 6: 297-309.
- Thornley JHM.** 2001. Simulating Grass-Legume Dynamics: a Phenomenological Submodel. *Annals of Botany*, 88: 905-913.
- Tsialtas JT, Handley LL, Kassioumi MT, Veresoglou DS, Gagianas AA.** 2001. Interspecific variation in potential water-use efficiency and its relation to plant species abundance in a water-limited grassland. *Functional Ecology*, 15: 605-614.
- Wang GH.** 2003. Differences in leaf  $\delta^{13}\text{C}$  among four dominant species in a secondary succession sere on the Loess Plateau of China. *Photosynthetica*, 41: 525-531.
- Werner C, Schnyder H, Cuntz M, Keitel C, Zeeman MJ, Dawson TE, Badeck FW, Brugnoli E, Ghashghaie J, Grams TEE, Kayler ZE, Lakatos M, Lee X, Máguas C, Ogée J, Rascher KG, Siegwolf RTW, Unger S, Welker J, Wingate L, Gessler A.** 2012. Progress and challenges in using stable isotopes to trace plant carbon and water relations across scales. *Biogeosciences*, 9: 3083-3111.
- Wright GC, Hubick KT, Farquhar GD, Rao RCN.** 1993. Genetic and environmental variation in transpiration efficiency and its correlation with carbon isotope discrimination and specific leaf area in peanut. En: *Stable Isotopes and Plant Water Relations*. San Diego: Academic Press. pp. 247-266.