



Universitat de Lleida

## Caracterización agronómica, genética y composición química de una colección de variedades de esparceta

Samir Farouk Demdoum

Dipòsit Legal: L.1322-2013

<http://hdl.handle.net/10803/124106>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

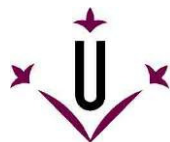
**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA, GENÉTICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA  
DE UNA COLECCIÓN DE VARIEDADES DE ESPARCETA**



**Samir Demdoun  
Lleida, Enero 2012**



**Universitat de Lleida**  
**Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal**

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA, GENÉTICA  
Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE UNA COLECCIÓN  
DE VARIEDADES DE ESPARCETA**

Presentada por Samir Demdoum para optar al grado de doctor por la Universitat de Lleida

Dirigida por:  
Dr. Ignacio Delgado Enguita

**Unidad de Tecnología en Producción Animal**  
**Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón**





IGNACIO DELGADO ENGUITA, Doctor Ingeniero Agrónomo e Investigador del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón

CERTIFICA que la presente memoria: “CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA, GENÉTICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE UNA COLECCIÓN DE VARIEDADES DE ESPARCETA”, elaborada por SAMIR DEMDOUM, ha sido realizada bajo su dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universitat de Lleida

Lleida, a 15 de Noviembre de 2011

El doctorando

El director de la tesis,

Fdo. Samir Demdoum

Fdo. Ignacio Delgado Enguita



Quería expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que de una u otra manera me han apoyado y han hecho posible la realización de esta tesis:

Al programa Marie Curie de la Comisión Europea (Project: Marie Curie Research Training Network-CT-2006-035805) por financiar esta tesis y proveerme de tantas oportunidades en el aprendizaje.

Al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón y al Gobierno de Aragón en cuyas instalaciones se ha realizado este trabajo.

A Ignacio Delgado, por tu profesionalidad, tu respaldo y tu paciencia. Por ser como eres, constante y voluntario, y estimularme para seguir adelante. Por todo ello y más, gracias.

A Fernando Muñoz, por tu cercanía, por abrirme campos y hacer que todo sean facilidades.

A José Valderrábano, por tu implicación y tu empeño: sin no está perfecto, no está bien!

A María Herrero y Ana Wunsch, por despertar mi curiosidad y facilitarme los medios para seguirla. Por enseñarme, más allá del conocimiento, otras formas de trabajar y disfrutar de la ciencia.

A los miembros del proyecto HealthyHay, en particular a Heidi Halbright, por su empeño a la hora de proveernos de los mejores cursos y que los disfrutemos.

A Donato Andueza y José Luis Alabart, por su indulgencia frente a mis dudas estadísticas.

A Angelines Legua, Juan Ángel Tanco y Miguel Ángel Céspedes, por su ayuda en todos momentos, su asesoramiento y su apoyo.

A Marisol Luis y José Folch por su ayuda en la redacción de esta tesis.

A Reyes, María Carmen, Teresa Bespín, Engracia Guerra, Juan Manuel Losada, Teresa Fustero, Ariana Cachi, Laura Carrera y Afif Hedhdly por brindarme ayudas y consejos.

A los amigos del proyecto HealthyHay, por lo enriquecedoras que han sido nuestras conversaciones y por vuestra solidaridad.

A Patrick von Aderkas y René Rohr, por impulsarme en esta aventura.

A mis amigos de Francia, de España o esparcidos a los cuatros vientos, por estar siempre tan cercanos.

A ma famille, pour croire en moi, faire de moi qui je suis et être qui ils sont. Maman, Papa: cette thèse vous revient.

A todas las personas grandes, y han sido muchas, que han estado conmigo en estos cuatro años, que habéis contribuido a que esta etapa de mi formación sea una experiencia en mi vida inolvidable: Gracias !





*A mes parents et grand parents,*





La esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) es una leguminosa forrajera tradicional en Europa, apreciada por los ganaderos por su apetecibilidad, alto valor nutritivo y no producir meteorismo en los animales. A pesar del descenso habido en las superficies cultivadas desde los años 60, el cambio hacia una agricultura más sostenible ha reactivado el interés por esta planta. Para mejorar en el conocimiento del cultivo, la presente tesis ha tenido como objetivos estudiar la variabilidad de una colección de variedades de esparceta a nivel agronómico y genético, así como evaluar la incidencia de diferentes ritmos de corte sobre el rendimiento, la composición química del forraje y el estado de reservas radiculares de las plantas. Adicionalmente, se ha estudiado el proceso reproductor de la planta con el fin de avanzar en el conocimiento de la cinética del mismo y del grado de autoincompatibilidad de la esparceta.

Para ello, se diseñaron cuatro ensayos experimentales. En el ensayo I, se evaluó una colección de 23 variedades, 11 de ellas de origen nacional y 12 europeas, según criterios agronómicos, morfológicos y de composición química durante tres años. Este ensayo fue completado con el ensayo II, el cual estudió la diversidad genética de la colección de variedades de esparceta mediante el uso de microsatélites EST-SSR; en ausencia de *loci* de microsatélites disponibles en el género *Onobrychis*, se evaluó la transferibilidad de marcadores de microsatélites de *Medicago* y *Glycine* a especies de *Onobrychis*. El ensayo III estuvo enfocado hacia la determinación del efecto de diferentes ritmos de corte sobre el rendimiento y la composición química del forraje, así como su influencia sobre el estado de las reservas radiculares. Por último, el ensayo IV inició el estudio de la biología reproductiva de la esparceta, abordando la descripción morfológica de la flor, la caracterización de la fase progámica y de la cinética de su desarrollo, así como el estudio del nivel de autocompatibilidad de la planta.

En las condiciones del ensayo I, las 23 variedades expresaron importantes diferencias a nivel agromorfológico, notablemente en términos de intensidad de floración que osciló de 14,2 % a 91,4 % de plantas florecidas durante el primer año, de porte, presentando rangos de rastrero a erecto, de productividad con una variación de 1041 a 1776 g MS/planta en los dos años de cultivo, y una tasa de mortalidad del 50 % al 78 % al cabo de tres años, siendo, sin embargo, escasas las diferencias observadas a nivel de composición química. La división clásica entre variedades de tipo común o gigante fue insuficiente para describir las variedades, presentando muchas de ellas caracteres intermedios. Un grupo de ocho variedades destacó por sus buenos valores agromorfológicos. El transfer de microsatélites desde *Glycine* y *Medicago* permitió disponer de marcadores útiles para la esparceta. La agrupación de las variedades obtenida mediante microsatélites estuvo determinada principalmente por su origen geográfico. La aplicación de diferentes ritmos de corte no influyó en la producción anual, ni en su reparto estacional que fue del 39% de media en el primer corte, pero mejoró las reservas de la corona y raíces, que aumentaron del 15 % al 23 % entre cortes en inicio o en final de floración. La aplicación de cortes frecuentes, mejoró el contenido en proteína bruta en un punto y medio sobre la aplicación de cortes menos frecuentes. El estudio de la fase progámica posibilitó el establecimiento de la cinética del proceso reproductor de la esparceta y la realización de polinizaciones controladas. El nivel de cuajado no fue significativamente diferente cuando se practicó autopolinización o polinización cruzada, pero se apreció que existen mecanismos físicos y temporales que impiden la autopolinización.

Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) is a traditional forage legume in Europe; it is appreciated by farmers for its palatability, high nutritive value and no bloating properties. In spite of the decline in cultivated areas, the current move towards a more sustainable agriculture has reactivated the interest in this plant. With the purpose to contribute to its promotion, the present thesis had for objectives to study the variability of a sainfoin collection, at agronomic and genetic level, as well as to evaluate the incidence of different cutting regimes on the crop. Moreover, the reproductive process was studied with the aim to enlighten its kinetics and level of autoincompatibility.

To answer these questions, four essays were designed. In essay I, a collection of 23 varieties, 11 Spanish local varieties and 13 European varieties, were evaluated on agronomical, morphological and chemical composition criteria. This essay was completed by essay II, which studied the genetic diversity among the sainfoin collection by the use of EST-SSR microsatellites; in the absence of microsatellites loci available in *Onobrychis* genus, the transferability of microsatellites from *Medicago* and *Glycine* to *Onobrychis* species was assessed. Essay III was focused on the determination of the effect of different cutting regimes on forage yield and chemical composition, as well as its influence on radicular reserves status. Finally, essay IV initiated the study of sainfoin reproductive biology, starting with the morphological description of the flower, the characterization of the progamic phase and its kinetics and the assessment of sainfoin autoincompatibility level.

In the conditions of the essays, the 23 varieties expressed important differences at agromorphological level, notably in terms of flowering intensity, which oscillated between 14.2 % and 91.4 % flowering plants in the first year; growth habit, which ranged for prostrate to erect; productivity, with two years yields from 1041 to 1776 g DM/plant; and mortality with 50 % to 78 % of dead plants at the end of the third year. However, few differences were observed in chemical composition. The classic division between giant and common varieties was insufficient to describe the collection varieties, many of them presenting intermediate characteristics. A group of eight varieties stood out by its positive agromorphological values. The microsatellites transfer from *Medicago* and *Glycine* permitted to obtain markers useable in sainfoin. The grouping obtained by microsatellites was mainly influenced by the geographic origin of the varieties. In respect to the cutting regime study, the application of high cutting intensity, up to six cuts per year, did not help to homogenise forage distribution, standing out the first cut proportion that represented 47 % annual production. Nevertheless, the application of different cutting regimes influenced forage quality and crown and root reserves status, which increased by 15 % to 23 % between cuts in the start or at the end of flowering. The study of the progamic phase enabled the establishment of reproductive process kinetics in sainfoin and the execution of controlled pollinations. The fruit set did not differ significantly in case of self or cross pollinations, but physical and temporal mechanisms restrain self-pollination.

La trepadella (*Onobrychis viciifolia* Scop.) és una lleguminosa farratgera tradicional a Europa, apreciada pels ramaders per la seva apetecibilitat, alt valor nutritiu i per no produir meteorismes als animals. Tot i el descens que hi ha hagut de superfícies conreades des dels anys 60, el canvi cap a una agricultura més sostenible ha reactivat l'interès per aquesta planta. Amb la finalitat de contribuir a la seva promoció, la present Tesis ha tingut com objectius estudiar la variabilitat d'una col·lecció de trepadelles a nivell agronòmic i genètic, així com avaluar la repercussió de diferents ritmes de tall sobre el cultiu. Addicionalment s'ha estudiat el procés reproductor de la planta amb la finalitat d'avançar en el coneixement de la seva cinètica i del grau de auto- incompatibilitat de la trepadella.

Per això, es van dissenyar quatre assaigs experimentals. En el assaig I es va avaluar una col·lecció de 23 varietats, 11 de les quals d'origen nacional i 13 europees, segons criteris agronòmics, morfològics i de composició química durant tres anys. Aquest estudi va ser completat amb l'assaig II, en el que es va estudià la diversitat genètica de la col·lecció de trepadelles mitjançant l'ús de microsatèl·lits ETS-SSR; en absència de loci de microsatèl·lits disponibles en el gènere *Onobrychis*, es va avaluar la transferibilitat de marcadors de microsatèl·lits. L'assaig III està encarat cap a la determinació del efecte de diversos ritmes de tall sobre el rendiment i la composició química del farratge, així com a la seva influència sobre l'estat de les reserves radiculars. Per últim, l'assaig IV va iniciar l'estudi de la biologia reproductiva de la trepadella, abordant la descripció morfològica de la flor, la caracterització de la fase progàmica i la cinètica del seu desenvolupament i el estudi del nivell de autocompatibilitat de la planta.

En les condicions del experiments, las 23 varietats varen expressar importants diferències a nivell agromorfològic, notanment en termes d'intensitat de floració que va oscil·là entre el 14,2% i el 91,4% de plantes florides durant el primer any, de presència que va tenir un rang de arrossegat a erecte, de productivitat, amb una variació de 1041 a 1776 g MS/planta en el segon any de cultiu, i de mortalitat amb el 50% al 78% de plantes mortes al cap de tres anys, sent, malgrat tot, escasses les diferències observades a nivell de composició química. La divisió clàssica entre varietats de tipus comú o gegant, va ser insuficient per descriure les varietats, moltes d'elles presentant caràcter intermig. Un grup de vuit varietats va destacar per els seus valors agromorfològics. El transfer de microsatèl·lits des de *Glycine i Medicago* va permetre disposar de marcadors útils per la trepadella. L'agrupació de les varietats obtingudes mitjançant microsatèl·lits va està determinada principalment per el seu origen geogràfic. En el que respecta al estudi del ritme de tall, l'aplicació de talls freqüents, fins sis talls per any, no va permetre homogeneïtzar la distribució del farratge, destacant la proporció del primer tall, sent la mitjana el 47% de la producció anual. Malgrat tot, l'aplicació de diferents ritmes de tall, va tenir una influència al mateix temps sobre la qualitat del farratge i sobre l'estat de les reserves de la corona i arrels, que varen augmentar del 15% al 23% des de el inici al final de la floració. L'estudi de la fase progàmica, va possibilitar l'establiment de la cinètica del procés reproductor i la realització de pol·linitzacions controlades. El nivell de quallat no va ser significativament diferent en el cas de autopol·linització o de pol·linització creuada, però sí que es va apreciar que existeixen mecanismes físics i temporals que impedeixen la autopol·linització.

Le sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) est une légumineuse fourragère traditionnelle en Europe ; elle est appréciée par les agriculteurs pour son appétibilité, sa haute valeur nutritive et sa capacité à ne pas produire de météorisme chez les animaux. Malgré le déclin dont ont souffert les superficies cultivées depuis les années 60, la tendance à une agriculture plus durable a réactivé l'intérêt pour cette plante. Avec l'intention de contribuer à sa promotion, la présente thèse a tenu pour objectifs d'étudier la variabilité d'une collection de sainfoin aux niveaux agronomique et génétique, ainsi que d'évaluer l'incidence de différents rythmes de coupe sur la parcelle. De plus, le processus reproducteur de la plante a été étudié afin d'avancer dans la connaissance de sa cinétique et de son degré d'autoincompatibilité.

Pour ce faire, quatre essais ont été mis en place. Dans l'essai I, une collection de 23 variétés, 11 variétés locales espagnoles et 12 européennes, a été évaluée selon des critères agronomiques, morphologiques et de composition chimique durant trois ans. Cet essai fut complété par l'essai II, lequel étudia la diversité génétique de la collection de sainfoin par l'emploi de microsatellites EST-SSR ; en l'absence de microsatellites disponible dans le genre *Onobrychis*, la transférabilité de marqueurs provenant de *Medicago* et *Glycine* à des espèces d'*Onobrychis* a été évaluée. L'essai III s'est focalisé sur la détermination de l'effet de différents rythmes de coupe sur le rendement et la composition chimique du fourrage, ainsi que son influence sur l'état des réserves racinaires. Enfin, l'essai IV initie l'étude de la biologie reproductive du sainfoin, abordant la description morphologique de la fleur, la caractérisation de la phase progamique et la cinétique de son développement, ainsi que l'étude du niveau d'autoincompatibilité de la plante.

Dans les conditions des essais, les 23 variétés exprimèrent des différences importantes au niveau agromorphologique, notamment en termes d'intensité de floraison, dont les valeurs oscillèrent entre 14,2 % et 91,4 % de plantes fleuries durant la première année, de port, qui fluctua de prostré à érigé, de productivité, avec une variation de 1041 à 1776 g MS/plante en deux années de culture, et de mortalité avec de 50 % à 78 % de plantes mortes au bout de trois ans. Toutefois les différences observées au niveau de la composition chimique furent faibles. La division classique entre variétés de type commun ou géant fut insuffisante pour décrire les variétés, beaucoup d'entre elles présentant des caractères intermédiaires. Un groupe de huit variétés s'illustra pour ses bonnes valeurs agromorphologiques. Le transfert de microsatellites depuis *Glycine* et *Medicago* permit de disposer de marqueurs valides pour le sainfoin. Le regroupement des variétés obtenu à l'aide de microsatellites fut influencé principalement par son origine géographique. En ce qui concerne l'étude du rythme de coupe, l'application de coupes fréquentes, jusqu'à six coupes à l'année, ne permit pas d'homogénéiser la répartition du fourrage, la proportion de la première coupe se distinguant, puisqu'elle représenta en moyenne 47 % de la production annuelle. Cependant, l'application de différents rythmes de coupe se répercuta sur la qualité du fourrage et sur l'état de réserves de la couronne et des racines, qui augmentèrent de 15 % à 23 % entre coupes réalisées au début et à la fin de la floraison. L'étude de la phase progamique a rendu possible l'établissement de la cinétique du processus reproducteur chez le sainfoin et la réalisation de pollinisations contrôlées. Le niveau de nouaison ne fut pas significativement différent dans le cas d'autopollinisation ou de pollinisation croisée, mais l'existence de mécanismes physiques et temporeux qui empêchent l'autopollinisation pu être appréciée.







## ÍNDICE

	pp
<b>Agradecimientos</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>Summary</b>	<b>10</b>
<b>Resum</b>	<b>11</b>
<b>Résumé</b>	<b>12</b>
<b>Índice</b>	<b>15</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>21</b>
<b>I. Introducción general</b>	<b>23</b>
<b>II. Revisión bibliográfica</b>	<b>27</b>
I. Pasado y presente del cultivo	27
I.1. Domesticación y expansión del cultivo	27
I.2. Situación actual en España y en el mundo	28
I.3. Esparcetas de uno y dos cortes	30
II. Botánica y biología de la esparceta	32
II.1. Taxonomía del género <i>Onobrychis</i>	32
II.2. Descripción botánica de la especie <i>O. viciifolia</i> Scop.	33
II.3. Ploidía	34
III. Características agronómicas de interés para el estudio	35
III.1. Hábitat	35
III.2. Siembra	35
III.3. Inoculación y fijación de nitrógeno	36
III.4. Abonado	37
III.5. Plagas y enfermedades	37
III.6. Control de malas hierbas	38
IV. Caracterización de la esparceta	38
IV.1. Aspectos agromorfológicos de interés para la caracterización	38
1.5.1.1. Alternatividad	38
1.5.1.2. Porte	38
1.5.1.3. Estados fenológicos y fecha de floración	40
IV.2. Caracterización genética	41
V. Optimización del aprovechamiento del cultivo	41

V.1. Régimen de aprovechamientos	42
V.2. Movilización de reservas	43
V.3. Altura de la defoliación	45
V.4. Distribución anual de la producción de forraje	45
V.6. Persistencia	46
VI. Producción y calidad del forraje	46
VI.1. Producción de materia seca	46
VI.2. Parámetros de calidad del forraje	47
VI.3. Factores que afectan a la calidad del forraje	47
VII. Biología reproductiva y producción de semilla	51
VII.1. Biología reproductiva de la esparceta	51
VII.2. Producción de semilla	52
VIII. Referencias bibliográficas	53
<b>III. Objetivos de la tesis</b>	<b>63</b>
<b>Ensayo I: Caracterización agronómica y composición química de una colección de esparcetas</b>	
I. Objetivos	65
II. Material y métodos	65
II.1 Localización del experimento y condiciones físicas de la parcela	65
II.2. Material vegetal	66
II.3. Diseño experimental	67
II.3.1 Manejo del ensayo	68
II.3.2 Parámetros evaluados	69
II.3.2.1 Intensidad de floración	69
II.3.2.2 Porte	69
II.3.2.3 Plagas y enfermedades	69
II.3.2.4 Fecha de corte	69
II.3.2.5 Producción de materia seca por planta	69
II.3.2.6 Mortalidad	70
II.3.2.7 Determinaciones analíticas	70
II.3.2.7.1 Proteína bruta	70
II.3.2.7.2 Cenizas	70
II.3.2.7.3 Fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente	70
II.3.2.7.4 Taninos condensados	71
II.3.2.7.5 Utilización de la técnica NIRS para la determinación de la composición química del forraje	71
II.4 Análisis estadísticos	72
II.4.1 Análisis de la varianza	72
II.4.2 Análisis de componentes principales	73
III Resultados	74
III.1 Características agronómicas	74
III.1.1 Intensidad de floración	74

III.1.2 Porte	75
III.1.3 Fecha de corte	76
III.1.4 Plagas y enfermedades	78
III.1.5 Producción de materia seca por planta	79
III.1.6 Mortalidad	80
III.1.7 Análisis de componentes principales	81
III.2 Composición química de la materia seca	83
III.2.1 Contenido en proteína bruta	83
III.2.2 Contenido en cenizas	83
III.2.3 Contenido en fibra neutro detergente	83
III.2.4 Contenido en fibra ácido detergente	84
III.2.5 Contenido en lignina ácido detergente	84
III.2.6 Contenido en taninos condensados	84
III.2.7 Análisis de componentes principales	84
IV. Discusión	86
IV.1 Características agronómicas	86
IV.1.1 Intensidad de floración	86
IV.1.2 Porte	87
IV.1.3 Fecha de corte	87
IV.1.4 Enfermedades y plagas	88
IV.1.5 Mortalidad	88
IV.1.6 Producción de materia seca	89
IV.1.7 Análisis de componentes principales	90
IV.2 Composición química de la materia seca	91
V. Conclusiones	93
VI. Referencias bibliográficas	94
Anexo I	96

**Ensayo II: Amplificación inter-genérica de EST-SSRs y similitud genética en el género *Onobrychis***

I. Objetivos	109
II. Material y métodos	109
II.1 Material vegetal y extracción de ADN	109
II.2 Análisis de los SSRs	110
II.3 Análisis de los datos	112
III. Resultados	112
IV. Discusión	114
IV.1 Transferibilidad inter-genérica	115
IV.2 Similitud genética	115
V. Referencias bibliográficas	117
Anexo II.a	119

**Ensayo III: Efecto del ritmo de corte sobre el rendimiento, la composición química del forraje y la dinámica de reservas radiculares en dos variedades de esparceta**

I. Objetivos	131
II. Material y métodos	131
II.1 Localización y condiciones físicas del ensayo	131
II.2. Material vegetal e implantación	133
II.3. Diseño experimental	134
II.3.1 Manejo del ensayo	134
II.3.2 Parámetros agromorfológicos	135
II.3.2.1 Longitud de la parte aérea	135
II.3.2.2 Peso de la parte aérea	135
II.3.2.3 Número de tallos	135
II.3.2.4 Número de inflorescencias	135
II.3.2.5 Proporción de hojas	135
II.3.2.6 Número de folíolos	135
II.3.2.7 Peso de la corona	136
II.3.2.8 Longitud de la raíz	136
II.3.2.9 Diámetro de la raíz	136
II.3.2.10 Peso de la raíz	136
II.3.3 Determinaciones analíticas	136
II.3.3.1 Proteína bruta	136
II.3.3.2 Fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente	137
II.3.3.3 Carbohidratos no estructurales	137
II.3.3.4 Taninos condensados	137
II.3.3.5 Ecuaciones de calibración NIRS para la determinación de la composición química de las muestras	138
II.4 Análisis estadísticos	138
II.4.1 Análisis de la varianza	138
III Resultados	140
III.1 Parámetros agromorfológicos	140
III.1.1 Longitud de la parte aérea	142
III.1.2 Peso de la parte aérea	143
III.1.3 Número de tallos	144
III.1.4 Número de inflorescencias	145
III.1.5 Proporción de hojas	145
III.1.6 Número de folíolos	146
III.1.7 Peso de la corona	147
III.1.8 Longitud de la raíz	148
III.1.9 Diámetro de la raíz	148
III.1.10 Peso de la raíz	149
III.2 Composición química de la materia seca	150
III.2.1 Composición química de la parte aérea	150
III.2.1.1 Contenido en proteína bruta	151

III.2.1.2 Contenido en fibra neutro detergente	152
III.2.1.3 Contenido en fibra ácido detergente	152
III.2.1.4 Contenido en lignina ácido detergente	153
III.2.1.5 Contenido en taninos condensados	154
III.2.2 Composición química de la corona y de la raíz	155
III.2.2.1 Contenido en almidón de la corona	156
III.2.2.2 Contenido en azúcares solubles de la corona	157
III.2.2.3 Contenido en proteína bruta de la corona	157
III.2.2.4 Contenido en almidón de la raíz	158
III.2.2.5 Contenido en azúcares solubles de la raíz	158
III.2.2.6 Contenido en proteína bruta de la raíz	159
IV Discusión	160
IV.1 Producción de forraje	160
IV.2 Composición química del forraje	161
IV.3 Dinámica de las reservas	162
IV.3 Tipificación de las variedades	164
V. Conclusiones	166
VI. Referencias bibliográficas	169

## **Ensayo IV: Biología reproductiva de la esparceta**

I. Objetivos	171
II. Material y métodos	171
II.1 Localización, condiciones físicas del ensayo	171
II.2. Material vegetal	171
II.3. Procesado de las muestras	171
III.3.1. Obtención del polen	171
III.3.2. Observación a la lupa y al microscopio	172
II.4. Diseño experimental	172
II.4.1 Desarrollo de la floración	172
II.4.2 Prueba de mantenimiento de flores en laboratorio	173
II.4.3 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo	173
II.4.4 Secuencia de la fase progámica en campo, con polinización controlada	173
II.4.5 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo, con polinizaciones controladas	173
II.4.6 Viabilidad del polen y puesta a punto del método de fluorescencia:	174
II.4.6.1 Concentración de fluoresceína	174
II.4.6.2 Tiempos de medición	174
II.4.6.3 Hidratación previa del grano de polen	174
II.4.6.4 Concentración de sacarosa	174
II.4.6.5 Viabilidad del polen: pruebas de germinación	175
II.4.6.6 Viabilidad del polen: a lo largo del día	175
II.4.6.7 Viabilidad del polen tras el desarrollo de la flor	175
II.4.7 Estimación del nivel de autocompatibilidad efectiva en campo	175

II.4.8 Seguimiento del crecimiento de tubos polínicos con auto y alopolinización en campo	175
II.5 Análisis estadísticos	176
III Resultados	177
III.1 Desarrollo de la floración	177
III.2 Prueba de mantenimiento de flores en laboratorio	180
III.3 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo	181
III.4 Secuencia de la fase progámica en campo, con polinización controlada	183
III.5 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo, con polinizaciones controladas	185
III.6 Viabilidad del polen y puesta a punto del método de fluorescencia	187
III.6.1 Concentración de fluoresceína	187
III.6.2 Tiempos de medición	188
III.6.3 Hidratación previa del grano de polen	188
III.6.4 Concentración de sacarosa	189
III.6.5 Viabilidad del polen: pruebas de germinación	189
III.6.6 Viabilidad del polen: a lo largo del día	189
III.6.7 Viabilidad del polen tras el desarrollo de la flor	190
III.7 Estimación del nivel de autocompatibilidad efectiva en campo	191
III.8 Seguimiento del crecimiento de tubos polínicos con auto y alopolinización en campo	192
III.9 Estimación del nivel de autocompatibilidad en el caso de polinización controlada, en campo	192
IV Discusión	192
IV.1 Secuencia de la fase progámica	193
IV.2 Viabilidad polínica	194
IV.3 Auto(in)compatibilidad	195
V. Conclusiones	197
VI. Referencias bibliográficas	198
<b>IV. Conclusiones generales</b>	<b>201</b>

IF	inicio de floración
PF	plena floración
FF	final de floración
IF1, IF2	corte realizado en inicio de floración
MS	materia seca
PB	proteína bruta
Cz	cenizas
FND	fibra neutro detergente
FAD	fibra ácido detergente
LAD	lignina ácido detergente
TC	taninos condensados
AL	almidón
AZ	azúcares solubles
C1, C2, C3...	primer corte, segundo corte etc.
C12, C22...	segundo corte del primer año, segundo corte del segundo año etc.
EST-SSR	simple sequence repeats EST, microsatélites
R	reflectancia





## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las leguminosas forrajeras tienen una gran importancia en la agricultura y la ganadería. En asociación con las bacterias del género *Rhizobium*, reducen el nitrógeno atmosférico a amoníaco, el cual es posteriormente transformado en proteínas y entra a formar parte de la dieta de los rumiantes. El nitrógeno atmosférico fijado contribuye, asimismo, a través de la descomposición de la materia orgánica de las plantas muertas, a disminuir la aportación de fertilizantes nitrogenados inorgánicos a otros cultivos agrícolas sembrados posteriormente (Frame *et al.* 1998; Rochon *et al.* 2004; Thomson 1976).

El empleo generalizado de las leguminosas fue un factor clave en las revoluciones agrarias que tuvieron lugar en Europa durante el siglo XIX. Su introducción en las rotaciones de cultivos y como componente de las praderas fue esencial hasta la década de los años 50 del pasado siglo, momento a partir del cual tuvo lugar el abaratamiento de los fertilizantes nitrogenados de síntesis y su aplicación creciente a los cultivos agrícolas, ocasionando un descenso progresivo del cultivo de las mismas (Gabarrou 1993; Rochon *et al.* 2004).

En la actualidad, se ha renovado el interés por las leguminosas, en general, y por las forrajeras, en particular, debido a su impacto en la economía de las explotaciones y en el medio ambiente, dado que reducen el consumo de fertilizantes nitrogenados inorgánicos y manifiestan capacidad productiva en medios desfavorables (Comisión Europea 2002).

La esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) es una leguminosa forrajera plurianual que reúne numerosas cualidades agronómicas y zootécnicas. Entre sus cualidades agronómicas destacan su acomodación a los climas fríos y semiáridos, y a suelos delgados, por lo que permanece verde durante el invierno y concentra la producción de forraje en primavera, cuando es más eficiente el uso de la humedad del suelo y de la radiación incidente (Benaiges 1971; Cooper 1972; Delgado *et al.* 2008b; Frame *et al.* 1998; Koch *et al.* 1972). En lo que respecta a sus cualidades zootécnicas, la planta presenta un alto contenido en proteína bruta, es palatable y su capacidad de ingestión voluntaria es superior a la de otras leguminosas como la alfalfa y el trébol violeta (Beever *et al.* 1986; Karnezos *et al.* 1994; Sheldrick y Thomson 1982; Spedding y Diekmahns 1972); por otra parte, contiene taninos condensados en las hojas, los cuales reducen la degradación de las proteínas en el rumen, favoreciendo la absorción de los aminoácidos en el intestino delgado (Jones y Mangan 1977; Nguyen *et al.* 2005; Waghorn *et al.* 1990), lo que contribuye a reducir la emisión de metano a la atmósfera (Puchala *et al.* 2005). Los taninos son también la causa de su cualidad de no ser meteorizante para el ganado (Mc Mahon *et al.* 1999; Min *et al.* 2003) y tener propiedades antihelmínticas en las ovejas (Hoste *et al.* 2006; Min *et al.* 2003). Asimismo, se la considera una buena planta melífera por su prolongada floración y apreciación por las abejas domésticas y salvajes (Szalai 2001).

Dichas cualidades: capacidad para transformar el nitrógeno atmosférico en orgánico, adaptación a climas fríos, semiáridos y suelos pobres y alto valor nutritivo del forraje, benefician a los sistemas agrícolas y ganaderos de bajos inputs, y pueden constituir una contribución esencial a la agricultura sostenible (Davies y Hopkins 1996; Sprent y Manneje 1996).

En lo que respecta a España, la esparceta es muy apreciada; se equipara a la alfalfa en las zonas semiáridas, de altitud superior a 600 m, y es más adecuada que aquella en suelos pobres (Buendía Lázaro y García Salmerón 1965; Benaiges 1971; Caballero 1972).

Sus cualidades más destacadas, reflejadas por Montserrat y Capdevilla (1964), son las siguientes:

a) Es una planta regeneradora de la fertilidad edáfica por su eficiencia fijadora de nitrógeno atmosférico y por poseer una raíz pivotante, que permite incorporar materia orgánica en los niveles inferiores del suelo.

b) Presenta una alta capacidad productiva en los secanos semiáridos fríos, lo que se atribuye a su facultad para crecer con temperaturas diurnas próximas a 20 °C y nocturnas ligeramente superiores a 0 °C.

c) El forraje que produce es de alto valor nutritivo y permanece bastante estable durante un periodo prolongado de aprovechamiento del cultivo; no meteoriza al ganado y se mantiene verde en invierno, permitiendo al ganadero reducir la alimentación invernal en pesebre.

Estas características, le confieren un gran valor medioambiental, al ser un cultivo que puede contribuir a paliar la desertificación, mediante su utilización como una cubierta vegetal que protege el suelo de las tierras de cultivo marginales y fácilmente erosionables, a la vez que proporciona un pasto de calidad a la ganadería extensiva, contribuyendo a fijar una población rural ligada al territorio (Montserrat y Oliver 1975; Delgado 2007).

No obstante, a pesar de las cualidades descritas anteriormente, en suelos fértiles la esparceta es considerada una leguminosa secundaria de importancia local, debido a que presenta menor producción, persistencia y capacidad de rebrote después del primer corte que otras leguminosas como la alfalfa (Badoux 1965; Sheehy y Popple 1981), consecuencia posiblemente de un escaso proceso de selección, por lo que la regresión del cultivo en Europa fue en aumento a lo largo del siglo XX, como han denunciado diferentes autores: Badoux (1965) en Suiza, Doyle *et al.* (1984) en el Reino Unido, Proserpi *et al.* (1994) en Francia y Delgado *et al.* (2002) en España.

A la agricultura actual se le demanda una mayor producción de proteínas, un descenso en el consumo de fertilizantes nitrogenados de síntesis y un respeto por el medio ambiente, por lo que las instituciones promueven el uso de leguminosas como alternativa a otras forrajeras. La esparceta, por sus características de ser una planta plurianual, con gran potencialidad productiva en climas fríos y semiáridos y suelos pobres y calcáreos, no meteorizante para el ganado, ser su proteína poco degradable en el rumen y presentar propiedades antihelmínticas, es una especie a potenciar.

Algunos de los objetivos que se han propuesto para el fomento de su cultivo son el incremento de su capacidad productiva de forraje, la producción y viabilidad de la semilla (Doyle *et al.* 1984), la mejora de la persistencia en pastoreo para su incorporación a los sistemas sostenibles de producción ganadera en condiciones de estrés medioambiental (Rochon *et al.* 2004) y un mejor conocimiento de su aprovechamiento por el ganado (Frame *et al.* 1998).

A nivel mundial, el cambio hacia modelos de producción más extensivos y sostenibles ha reactivado el interés por las leguminosas forrajeras. Las cualidades de la esparceta, de las que sobresalen sus características agronómicas y su contenido moderado en taninos condensados, así como la historicidad de su cultivo en Europa la hacen una candidata ideal para contribuir a una ganadería más sostenible. Por estas razones, se ha aprobado el proyecto “HealthyHay”, en el seno del programa “Marie Curie” de la U.E, dentro del cual se encuadra esta tesis. En él han participado 14 equipos europeos con el fin de profundizar en el conocimiento de la esparceta. Con esta investigación interdisciplinaria de enfoque novedoso, se ha pretendido avanzar en el dominio de las características agronómicas, nutricionales y veterinarias de una colección de germoplasma europeo, así como de la composición de la esparceta en polifenoles y taninos, su vía de síntesis y modo de acción, y su impacto medioambiental.



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### I. PASADO Y PRESENTE DEL CULTIVO

#### I.1. Domesticación y expansión del cultivo

El cultivo de la esparceta en Europa no es antiguo; según De Candolle (1883) citado por Stebler (1894), no lo conocían los griegos ni sus descendientes. La planta designada por Dioscorides y Plinio con el nombre de *Onobrychis* no es la esparceta cultivada sino *O. caput-galli* All., que es espontánea en Grecia y no se cultivaba. El citado autor considera muy probable que se iniciase su cultivo en el Mediodía francés en el siglo XV y durante el siglo XVI se extendiera por todo el país, para pasar a Inglaterra durante el siglo XVII y a la Toscana italiana y a Suiza, durante el siglo XVIII. Otro autor (Blanco 1857), cita su domesticación y cultivo a finales del siglo XVI en el valle del Rin, desde donde se extendió al resto de Europa; dicho autor indica que esta planta es espontánea también en muchas localidades de España (sobre todo en la Sierra del Segura de Murcia).

Valcarcel (1798) cita que su cultivo estuvo muy extendido en esa época en Flandes, pero poco en Francia, casi nada en Inglaterra y no la cita cultivada en España, aunque la denomina esparceta o espargula. Valcarcel (1798) indica que algunas especies del género, que crecen silvestres cerca del mar, se siegan para forraje. Ni el fraile Agustín (1617) ni Asso (1798) en sus tratados sobre agricultura en España la citan. Su cultivo es citado por primera vez en España por Doyle (1799), Coello (1801) y Espinosa (1822) con el nombre de pipirigallo. Dichos autores resaltan las excelencias de su cultivo y aprovechamiento por el ganado. En la traducción al español de un tratado francés de agricultura que hace el Marqués De Travernet (1848), a la “esparcette” la denomina también pipirigallo. Antón Ramírez (1865) supone que la esparceta o pipirigallo “es indígena en España donde crece espontánea y, en estas condiciones, es bastante raquíta, pero cultivada en buenas condiciones mejora mucho su rendimiento”.

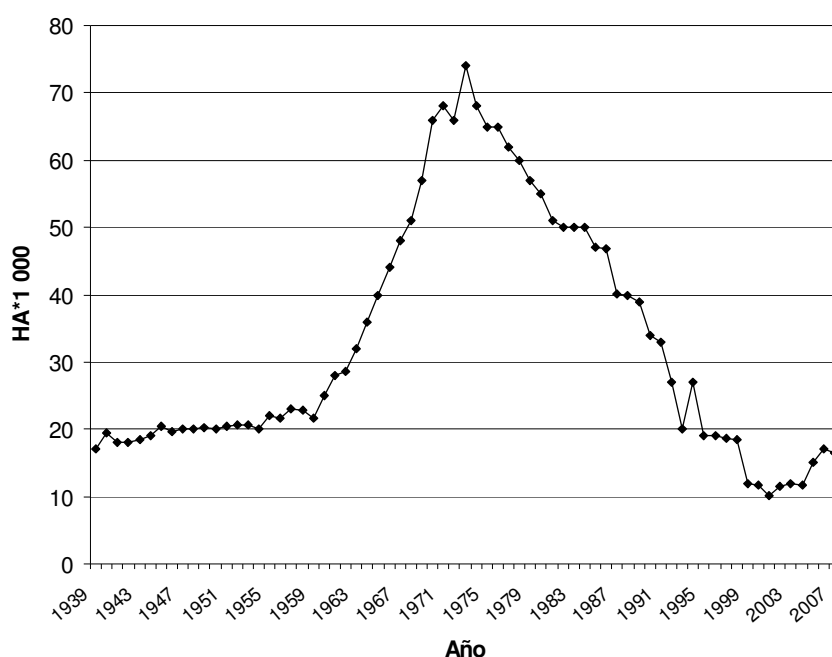
De sus cualidades agronómicas y forrajeras se cree que deriva el nombre del género en latín, ya que según Jacques (1894-1897), los asnos y otros rumiantes producían un rebuzno al saborearla (*ónos* = asno y *brýcho* = rebuzno). Inicialmente fue una especie relacionada con los géneros *Hedysarum* y *Sartoria* (Badoux 1965); de ahí que en diversos textos antiguos fuera denominada como *Hedysarum onobrychis*. Con el paso del tiempo sus aproximaciones al género *Onobrychis* la definieron como *Onobrychis sativa*. Stebler (1894) indica que, en 1760, un autor suizo la denominaba *Onobrychis foliis viciae*, por la similitud de sus hojas con las del género *Vicia*. En la actualidad se denomina *Onobrychis viciifolia*.

Los nombres comunes que se encuentran en la literatura son: Esparcette, Sainfoin, Fenasse, Foin de Bourgogne, Bourgogne, Herbe éternelle, Tête o Crête de Coq, etc. (Stebler 1894). Este autor sugiere que la palabra “esparcette” procede del español “esparceta” o “esparcilla” que puede derivar de “esparcir”. Asimismo, “sainfoin” puede provenir del francés saint foin = santo heno o también “heno sano”, en alusión a que el forraje no meteoriza. Con los nombres de sainfoin de Bourgogne y esparcette ya se cultivaba en el siglo XVII en Francia (Magne, 1845; Heuze, 1877). La palabra “pipirigallo” es sinónimo de “cresta de gallo” aludiendo, posiblemente, a la envoltura de la semilla con dicha parte del animal (María Moliner 1988). La expresión *cresta de gallo* es utilizada por Requejo y Tortosa (1912). También en Francia se conocía a la “esparcette” como “crête de coq” (Zolla 1904). Tuñón de Lara (1877), Subira Nicolau (1888), Requejo y Tortosa (1912 ) y Benaiges (1915), se refieren a pipirigallo como sinónimo de esparceta. Antón Ramírez (1865) cita al pipirigallo como la palabra española para denominar a la esparceta. En 1900 y 1903, técnicos españoles asisten a unas jornadas en la Escuela de Agricultura de Grignon (Francia), en busca de experiencias realizadas para difundirlas en nuestro territorio, y redescubren el cultivo de la esparceta, aunque según Arán (1929) ello no fuera necesario, ya que su cultivo y cualidades eran de sobra conocidas en España.

## I.2. Situación actual en España y en el mundo

La superficie destinada al cultivo en España tuvo un incremento continuado de 12.900 a 73.300 ha, entre 1939 y 1973, año en el que alcanzó el máximo desarrollo del cultivo debido a la promoción que realizó el Ministerio de Agricultura a comienzos de los años 70. Posteriormente, la superficie destinada al cultivo fue en regresión y en 2008 se cultivaron en España 15.979 ha, 97,2% de ellas en secano. Solamente en las dos últimas décadas, el cultivo se ha reducido en un 250%, entre otras razones debido a su no inclusión en las ayudas de la Política Agraria Comunitaria (Ministerio De Agricultura 1946-2010).

La **Figura I.2** refleja la evolución del cultivo durante dicho periodo.



**Figura I.2.** Evolución del cultivo de la esparceta en España entre los años 1939 y 2008

El cultivo de la esparceta se localiza casi su totalidad en 13 provincias del cuadrante Noreste de la península Ibérica, las cuales ocuparon de media el 96,9% de la superficie durante el periodo 1946-2008. En 2008 destacaron Teruel, Huesca, Lérida y Palencia por la superficie destinada a su cultivo con el 42,7%, 20,6%, 8,2% y 7,8% del total nacional, respectivamente; salvo en Lérida, el descenso del cultivo en ellas ha sido proporcionalmente menor al resto de las provincias, según se refleja en la **Tabla I.2**.

**TABLA I.2.** Superficie destinada a la esparceta en las provincias españolas con mayor importancia del cultivo durante el periodo 1946-2008

<b>Provincia</b>	<b>Media 1946-2008</b>	<b>Superficie porcentual 1946-2008</b>	<b>Año 2008</b>	<b>Superficie porcentual 2008</b>
Rioja (La)	596	1,64	232	1,45
Huesca	4349	11,96	3290	20,59
Teruel	11,246	30,92	6818	42,67
Zaragoza	2007	5,52	952	5,96
Barcelona	1857	5,11	220	1,38
Girona	1769	4,87	93	0,58
Lleida	4176	11,48	1305	8,17
Burgos	3765	10,35	967	6,05
Palencia	768	2,11	1250	7,82
Soria	2604	7,16	486	3,04
Cuenca	585	1,61	111	0,69
Guadalajara	1002	2,75	0	0,00
Castellón	876	2,41	59	0,37
Total 13 provincias	35,236	96,90	15,783	98,77
<b>TOTAL</b>	<b>36,365</b>	<b>100</b>	<b>15,979</b>	<b>100</b>

El cultivo de la esparceta experimentó en Europa un descenso similar al que sufrió en España. En Inglaterra, donde la esparceta es muy apreciada para la alimentación de los caballos, la superficie cultivada ha mermado desde 1920 (Bland 1971). Aproximadamente 150 toneladas de semillas se sembraban cada año en los años 50, lo que equivale a cerca de 2300 ha (Hill 1998); las superficies sembradas disminuyeron a 150 ha en 1970 y únicamente a 50 ha en 1983 (Aldrich 1984). Doyle *et al.* (1984) indicaron en un estudio económico que los rendimientos de la esparceta tienen que ser mejorados en un 35% (llegando 11,5 t MS/ha) para que pueda ser rentable. En condiciones experimentales, se obtuvieron en Inglaterra producciones de 14-16 t MS/ha sugiriendo la posibilidad de conseguir en el campo unas producciones de 12 t MS/ha.

Hill (1998), Rochon *et al.* (2004) y Hutchinson (1965) relacionaron el declive de la esparceta con la aparición de abonos nitrogenados baratos y variedades de raigrás mejoradas, así como con la expansión del cultivo de cereales de otoño para producción de forraje, sin olvidar la desaparición de los caballos de tiro, grandes consumidores de esparceta en Inglaterra o Francia (Newman 1997). Borreani *et al.* (2003) subrayaron la influencia que han tenido los cambios en las prácticas agrícolas y la reducción de las pequeñas explotaciones ganaderas de montaña sobre el declive del cultivo de esta leguminosa en Italia.

Este mismo efecto también se puede encontrar en España. Sin embargo, las características agronómicas de la esparceta, con una menor producción, persistencia y rebrote que la alfalfa no han contribuido al mantenimiento de su cultivo (Sims *et al.* 1968; Kallenbach *et al.* 1996). Turquía, donde la esparceta es uno de los forrajes preponderantes, es una excepción con 94.000 ha cultivadas (Anon 2001, citado por Eken *et al.* 2004).

### I.3. Esparcetas de uno y dos cortes

Como se expondrá más adelante, la esparceta que se cultiva en Europa presenta dos formas *O. viciifolia* f. *communis* y *O. viciifolia* f. *bifera*. Los caracteres morfológicos y agronómicos, distintivos de ambas, revisten una gran importancia práctica, teniendo aptitudes culturales diferentes: la primera, caracterizada porque es más persistente y solo florece una vez al año; la segunda se establece con rapidez y florece el año de siembra y después de cada corte, pero es menos persistente. Ello ha podido ser la causa de la denominación agronómica por la cual se las conoce históricamente como de “un corte o común” y de “dos cortes o gigante”.

Las referencias agronómicas relativas a dicha distinción y la descripción de las características de los dos tipos son frecuentes en la bibliografía antigua. Así, la existencia de una esparceta de dos cortes, mucho más productiva y vigorosa, más idónea para las tierras fértiles que la esparceta común proveniente de la montaña, más rústica y menos productiva, ya es citada por Magne (1845) y el conde Gasparín (1846).

En España, Blanco (1857) indica que existen dos tipos variedades, de uno y de dos cortes, y que de la esparceta común, se ha seleccionado la esparceta de dos cortes, más vigorosa y productiva. La Sociedad de Amigos Labradores y Propietarios Rurales (1871) edita un tratado de agricultura práctica en el que reconoce dos variedades de esparceta: la esparceta que se cultiva en Europa que puede ser de uno o de dos cortes, y el pipirigallo de España que es de un corte.

Stebler (1894) sugiere, asimismo, que la esparceta de dos cortes es una forma cultural de la de un corte, pero, contrariamente a los autores anteriores, indica que no aprecian grandes ventajas agronómicas entre los dos tipos de esparceta en ensayos efectuados en Suiza.

Palau (citado por Muller 1893), profesor del Jardín Botánico de Madrid, pudo ser el primero en introducir y sembrar en los alrededores de Madrid la esparceta de dos cortes, en 1791, indicando que si se sembraba en tierras pobres y áridas, vuelve pronto al tipo de la esparceta común.

En la bibliografía más reciente, diversos autores han efectuado estudios comparativos agromorfológicos, con el fin de describir ambos tipos. Thomson (1951) constató que la esparceta común no florecía el año de siembra y la gigante dos veces; el crecimiento inicial era más rápido en la gigante pero, en dos años de ensayos, la esparceta común fue la más productiva, lo mismo en condiciones de siega que de pastoreo; la común presentaba tallos más numerosos y cortos que la gigante en el momento del corte, mayor proporción de hojas y menor número de folíolos por hoja; la común florecía más precozmente y sólo en el primer corte, mientras que la gigante presentaba flores en todos los rebrotes, salvo en el de otoño.



Badoux (1965) llegó a las mismas conclusiones que Thomson (1951) y agregó que el diámetro del tallo era menor en la común; coincidió con este mismo autor en que la persistencia de las esparcetas de un corte era superior a las de dos cortes. Badoux (1965) observó que aunque las de un corte, en general, iniciaban el crecimiento a la salida de invierno, más tarde que las de dos cortes, había variación en función de la procedencia de las semillas, por lo que ponía en cuestión la validez de algunos resultados experimentales cuando se comparan semillas procedentes de lugares muy diferentes.

Cooper (1972) coincidió con los anteriores en que la esparceta de un corte presentaba mayor área foliar y la de dos cortes mayor precocidad de crecimiento a la salida de invierno y rapidez del rebrote, pero observó contrariamente que esta última florecía antes. Apreció, asimismo, una mayor producción en primavera en la esparceta de un corte y un mejor reparto de la producción anual en la de dos cortes. Concluyó que la esparceta de dos cortes era algo más productiva que la de un corte al cabo de cuatro años debido, principalmente, a la mayor producción del primer año, y ambas tenían una persistencia similar. Sugirió que la adaptación a la sequía podía deberse a su aptitud para crecer en el periodo de mayor humedad y radiación incidente.

Michelena y Hycka (1988), estudiando una colección de procedencias españolas, encontraron que las esparcetas de un corte se diferenciaban de las de dos cortes por su mayor precocidad de floración, número de tallos/planta, foliolos/hoja, relación hoja/tallo, inflorescencias/planta y producción de materia seca; por el contrario, aquellas tenían menor altura del tallo, diámetro de los tallos, área de los foliolos, crecimiento inicial, capacidad de rebrote y resistencia a oidio. Alibegovic-Grbic y Gataric (1989) obtuvieron resultados coincidentes con los de Michelena y Hycka (1988) en las esparcetas de la antigua Yugoslavia. Las esparcetas de un corte tenían menor altura y diámetro del tallo, y mayor número de tallos/planta y producción de materia seca.

Prosperi *et al.* (1994), contrariamente a los autores anteriores, encontraron que las esparcetas de un corte de origen francés eran menos productivas y persistentes, y emitían mayor número de tallos floríferos.

Delgado *et al.* (2008b) evaluando una colección de procedencias españolas apreciaron menor intensidad de floración y capacidad de rebrote en las esparcetas de un corte.

Estos autores coinciden en que las esparcetas de un corte no florecen el año de siembra, inician el crecimiento a la salida de invierno más tardíamente que las de dos cortes, presentan tallos más cortos y abundantes y de menor diámetro, mayor frondosidad y menor capacidad de rebrote tras el corte, pero existen discrepancias sobre algunos caracteres agronómicos como capacidad de producción de forraje, precocidad de la floración y persistencia. Ello podría ser atribuido a la procedencia de las semillas estudiadas, según Badoux (1965), a veces adaptadas a hábitats muy diferentes, o con diferente grado de mejora, lo que ha podido modificar su valor agronómico inicial.

Michelena (1983) y Delgado *et al.* (2008b) pusieron de manifiesto la existencia de un tercer grupo de semillas de esparceta con un alto grado de variabilidad, en el que se apreciaban plantas individuales con formas transitorias entre los tipos de uno y dos cortes. Badoux (1965) ya había sugerido que, dado que ambos tipos proceden de un tronco común, la separación entre ellos podría deberse a causas agronómicas, como consecuencia del periodo en el que tiene lugar la recolección de la semilla; si la recolección se efectuaba en el segundo periodo de floración, la selección natural tendería a orientarse hacia las esparcetas de dos cortes por su mayor capacidad de florecer tras el primer aprovechamiento; si la recolección de semilla se realizaba en la primera floración, pero en los últimos años productivos, coincidiendo con el descenso de la producción de forraje, la selección se orientaría hacia las esparcetas de un corte, dado que suelen mostrar mayor persistencia. Dicho grupo intermedio podría ser el resultado de los cruzamientos habidos entre los dos tipos de esparceta, como consecuencia del comercio indiscriminado de semilla y del cambio de usos del cultivo realizado por los agricultores (Delgado *et al.* 2002).

La mayoría de las variedades sintéticas obtenidas desde los años setenta hasta hoy son de tipo intermedio, como ‘Nova’ y ‘Melrose’ (Canada), ‘Eski’, ‘Remont’, ‘Remunex’ y ‘Shoshone’ (Estados Unidos), ‘Zeus’ y ‘Vala’ (Italia), ‘Perly’ (Suiza), ‘Fakir’ (Francia), ‘Emyr’ (Hungría) y ‘G35’ (Nueva Zelanda) (Gray *et al.* 2006; Rumball y Claydon 2005). Sin embargo, no se ha explotado suficientemente la diversidad importante que presenta la esparceta en términos de resistencia al frío, precocidad, producción o persistencia (Shaw 1968), lo que se atribuye a la escasa ambición de los programas de mejora que dieron lugar a estas variedades, así como a la ausencia de trabajos previos que aborden la distinción, homogeneidad y estabilidad de la esparceta (UPOV). Actualmente, sólo 18 variedades están registradas en el catálogo común de la Comunidad Europea.

([http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/agri2011/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/agri2011/index_en.htm))

## II. BOTÁNICA Y BIOLOGÍA DE LA ESPARCETA

### II.1. Taxonomía del género *Onobrychis*

El género *Onobrychis* comprende 126 especies botánicas, según la clasificación de Sirjaev (1925; citado por Badoux 1965) y es originario de Europa Oriental y Asia Central.

Cinco de las especies comprendidas dentro de este género son de uso agrícola en diversos lugares del mundo, principalmente este de Europa y Oriente medio: *O. sativa* Lam. (*O. viciifolia* Scop.), *O. sativa* var. *persica* (Sirjaev *pro var.*), *O. arenaria* (Kit.) Ser., *O. transcaucasica* Gross. y *O. montana* D.C., según Badoux (1965). Su delimitación sistemática está todavía incompleta, en evolución no concluida y unidas por transiciones, debido a su reciente origen del final del Mioceno (Sirjaev 1925; citado por Michelena 1983).

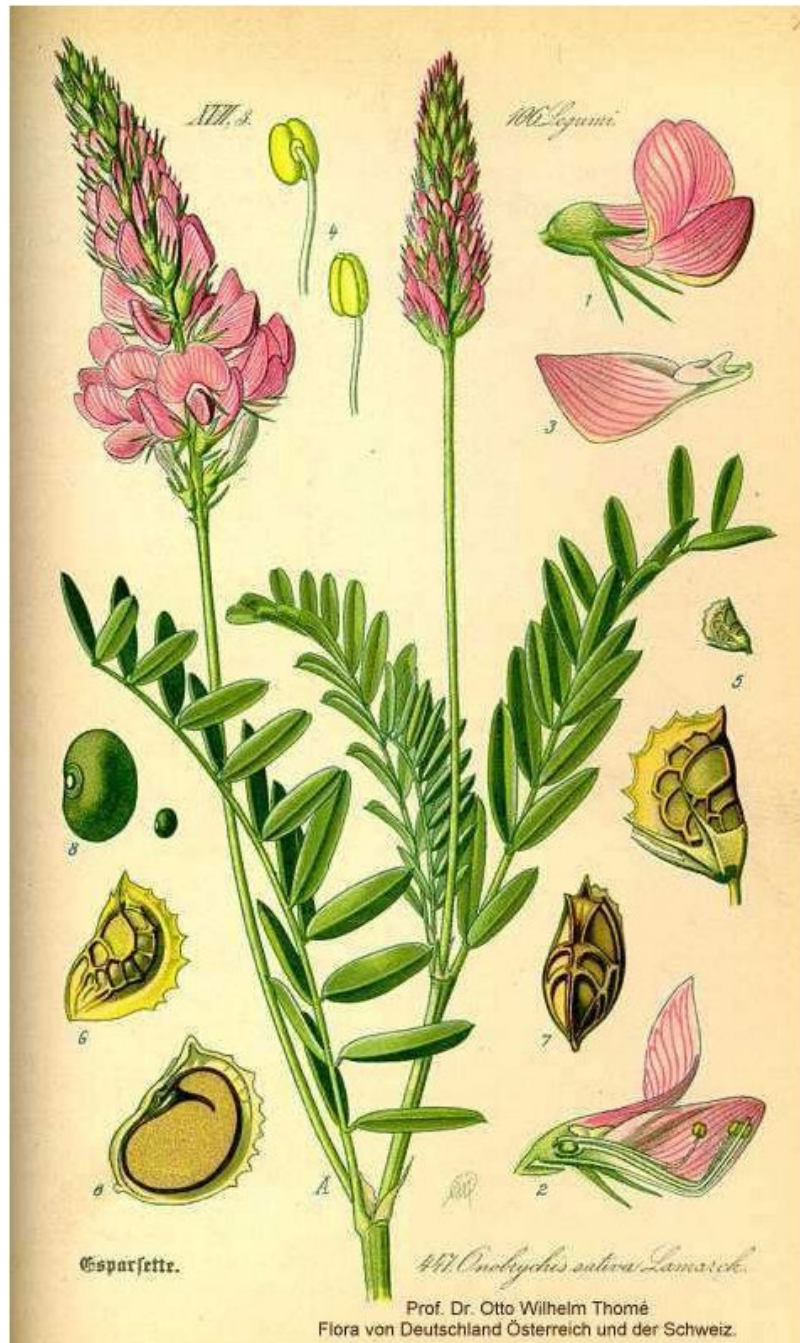
Badoux (1965) utilizó el término colectivo de *O. viciifolia* Scop. *sensu lato* a las citadas especies de interés agronómico, denominando *O. viciifolia* Scop. *sensu stricto* a *O. sativa*, en sus tres formas y variedades: f. *communis*, f. *bifera* y var. *persica*; la primera, caracterizada porque es persistente y sólo florece una vez al año; la segunda porque se establece con rapidez y florece el año de siembra y después de cada corte, pero es menos persistente; la tercera se distingue de las anteriores por algunos caracteres botánicos como tallos más finos, mayor número de foliolos por hoja, menor número de flores por inflorescencia y vainas exentas de dientes.

En España, se han descrito 10 especies del género *Onobrychis*: *O. capuz-galli* que es anual y *O. saxatilis*, *O. supina*, *O. reuteri*, *O. humilis*, *O. matritensis*, *O. argenta*, *O. pyrenaica*, *O. stenorrhiza*, y *O. viciifolia*, perennes (Valdés 2000). La única especie cultivada es *O. viciifolia* en sus dos formas, *communis* y *bifera* (Michelena 1983).

## II.2. Descripción botánica de la especie *O. viciifolia* Scop.

La morfología de la especie *O. viciifolia* Scop. según *Flora Iberica* (Valdés 2000) es la siguiente (**Figura II.2**):

Sufrútice hasta de 70 cm, de subglabro a tomentoso o seríceo, con pelos aplicados o patentes. Tallos de 20 a 60 cm, ascendentes o erectos, escasamente ramificados. Hojas de 7 a 20 cm, con pecíolo  $\pm$  largo, con 5 a 10 pares de foliolos; foliolos de 10 a 25 x 5 a 9 mm, oblongos, oblongo-elípticos o elípticos, de ápice obtuso o truncado. Inflorescencias densas, con más de 10 flores; pedúnculo de 12 a 20 cm. Flores con bractéolas de 0,6 a 1,5 mm. Cáliz con tubo de 2 a 2,5 mm, subglabro o laxamente tomentoso; dientes de 2,5 a 5 mm, hasta 2 veces más largos que el tubo, estrechamente triangulares. Corola 1,5 a 2 veces más larga que el cáliz, rosada, con nervios purpúreos, estandarte de 8,5 a 12 mm, más largo o más corto que la quilla, anchamente obovado u obovado-elíptico; quilla de 8 a 11 mm, de longitud 1,5 veces superior a la del cáliz, curvada en ángulo obtuso. Fruto de 5,5-7 x 4-5,4 mm, de contorno orbicular,  $\pm$  espinoso, pubescente, con pelos cortos y  $\pm$  patentes; margen dorsal con 5 a 9 dientes o espinas de 0,2 a 0,8 mm; caras con tubérculos o espinas de 0,1 a 0,3 mm. El fruto constituye una vaina sin líneas de dehiscencia o lomento que contiene una semilla con embrión voluminoso, rico en reservas amiláceas, proteicas y lipídicas. La dispersión del fruto es zoocora, facilitada por las espinas que lo recubre (Valdés 2000).



**Figura II.2.** Ilustración botánica de la esparceta (Flora de Alemania y Suiza, con autorización de [www.biolib.de](http://www.biolib.de))

### II.3. Ploidía

*O. viciifolia* tiene un número cromosómico de  $2n=2x=14$  en las plantas diploides y  $2n=4x=28$  en las tetraploides (Frame *et al.* 1998). Sin embargo, la mayoría de las referencias hacen mención únicamente de esparceta tetraploide con  $2n=4x=28$  (Kidambi *et al.* 1990).

Negri *et al.* (1987) analizaron la ploidía de 20 poblaciones de *O. viciifolia* y resultaron todas tetraploides. Hayot-Carbonero *et al.* (2010) encontraron únicamente tres poblaciones (silvestres) diploides de *O. viciifolia* en un estudio incluyendo 143 poblaciones, atribuyendo el carácter tetraploide al tipo cultivado.

### III. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE INTERÉS PARA SU ESTUDIO

#### III.1. Hábitat

La esparceta se adapta a un amplio rango de condiciones climáticas, lo que permite su cultivo en Europa, América del Norte, Australia y Nueva Zelanda, lo mismo en condiciones de secano que de regadío, siempre que sean suelos neutros o alcalinos (Bland 1971; Frame *et al.* 1998). No tolera los suelos encharcados y prefiere los bien drenados (Sheldrick *et al.* 1995).

En España, según la descripción del hábitat llevada a cabo por García Salmerón *et al.* (1966), la esparceta crece subespontánea en el sistema Ibérico, Prepirineo y cordilleras Costero Catalanas. Prefiere los climas mediterráneos subhúmedos de tendencia centroeuropea, siendo compatible con climas mediterráneos, semiáridos, moderadamente cálidos menos secos, secos y con los de alta montaña. Resulta incompatible con los subdesérticos, mediterráneos áridos, mediterráneos semiáridos cálidos, atlánticos y centroeuropeos. En la cuenca mediterránea, prefiere las altitudes superiores a los 600 m, si bien puede abarcar desde los 100 a los 2500 m. Prefiere los suelos pardos, aunque puede vivir en las fracciones menos ácidas de las tierras pardas. Es incompatible con los suelos podzoles, solonetzados, sierosem, tierras pardas meridionales ácidas y complejos de cualquiera de estas últimas, lo que denota una predilección de la especie por los suelos francamente calizos de pH básico o neutro. Es incompatible con los suelos de pH ácido. Prefiere los terrenos profundos a los medios. No tolera terrenos compactos.

Benaiges (1971) complementa y resume la descripción anterior indicando que la esparceta es poco sensible al frío y no resiste la extrema aridez y compacidad de las tierras. Esta especie se acomoda a los terrenos más pobres con tal de que sean permeables, calizos y algo frescos. La fertilidad de la tierra puede ser mediana si las condiciones de cal y humedad quedan satisfechas. Su sobriedad no le impide aprovecharse de condiciones más propicias y su productividad aumenta con la riqueza del medio en que se cultiva. Las alfalfas y los tréboles rinden más que la esparceta en las tierras fértiles y de regadío, pero ésta les aventaja en las tierras pobres sueltas, calizas y relativamente frescas.

En la encuesta practicada a 40 agricultores seleccionados por ser productores de semilla de esparceta de la península Ibérica (Delgado *et al.* 2002), se apreció que el 90% de las explotaciones de los encuestados se encontraban localizadas en zonas de altitud comprendidas entre 600 y 1474 m de altitud, en condiciones de clima semiárido y suelos calcáreos.

#### III.2. Siembra

En las zonas templadas de Europa (franja mediterránea), la esparceta puede sembrarse en otoño o al inicio de primavera. En las localizaciones de altitud o de latitud más elevada, la siembra suele realizarse en primavera cuando la temperatura se sitúa entre los 10 °C y 20 °C y no menos de 5 °C (Jensen y Sharp 1968). Una siembra temprana, cuando es posible, permite un mayor desarrollo de las plantas y, eventualmente, efectuar un aprovechamiento en el año de siembra. Siembras realizadas entre abril y julio no presentaron diferencias en producción al año siguiente en Inglaterra, sin embargo fueron más productivas que una siembra realizada entre agosto y septiembre (Liu y Lane 2005).

Se puede sembrar directamente el fruto, conteniendo una semilla, o la semilla liberada de la vaina seca. Algunos trabajos concluyeron que la germinación mejora con las semillas descascarilladas (Wiesner *et al.* 1968). Por el contrario, el efecto de la cascarilla da lugar a una germinación más escalonada, permitiendo amortizar perturbaciones climáticas, lo que puede explicar por qué Chen (1992) no encontró diferencias significativas en la emergencia en el campo. La siembra suele realizarse a una profundidad de 1 a 2 cm (Hill 1998), aunque Chen (1992) recomienda hacerlo a profundidades de 4 a 5 cm. Estas diferencias en las recomendaciones anteriores podrían deberse a la variación en la disponibilidad de agua y textura del suelo de los diferentes experimentos.

La utilización de semillas gruesas y bien maduras puede facilitar una emergencia más rápida y el establecimiento de plantas con mejor capacidad de fijación (Cash y Ditterline 1996). En un manejo tradicional son suficientes cantidades comprendidas entre 80 y 120 kg/ha de semillas con cascarilla y entre 40 y 50 kg/ha cuando están descascarilladas, para establecer una población de 70 a 150 plantas/m<sup>2</sup> el primer año y alcanzar las 50 a 60 plantas/m<sup>2</sup> en los años siguientes (Frame *et al.* 1998; Sheldrick *et al.* 1995). Ensayos realizados sobre densidades de siembra indicaron que con una densidad de 100 plantas/m<sup>2</sup> se obtiene la mayor producción en el año de establecimiento, sugiriendo una dosis de semilla óptima de 62,5 kg/ha, asumiendo un 80% de germinación (Sheehy *et al.* 1984).

### III.3. Inoculación y fijación de nitrógeno

La esparceta, como otras leguminosas, es capaz de establecer relaciones simbióticas con rizobacterias y hongos micorrizas, con los cuales intercambia azúcares procedentes de la fotosíntesis por nitrógeno y fósforo principalmente. La inoculación por micorrizas no ha sido estudiada en la esparceta pero se han alcanzado resultados alentadores en la zulla (*Hedysarum coronarium*) donde se logró mejorar no solamente la asimilación de nitrógeno sino también la de fósforo del suelo (Barea *et al.* 1987).

La inoculación de la esparceta con *Rhizobium* sp. puede realizarse con cepas aisladas de *Hedysarum*, *Coronilla* o *Dalea* (Burton y Curley 1968). Cuando se inoculó con especies extraídas de leguminosas árticas (*Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydelliana* y *Oxytropis arctobia*), la esparceta presentó una mejora en la fijación de nitrógeno durante el periodo frío de crecimiento (Prevost *et al.* 1987).

El nivel de fijación de nitrógeno para la esparceta se ha situado en la mayoría de los experimentos entre 130 y 160 kg/ha, frente a 140 a 210 kg/ha para la alfalfa (Provorov y Tikhonovich 2003), pudiendo alcanzar ambas un límite máximo de 270 kg/ha y 550 kg/ha de fijación de nitrógeno, respectivamente. La esparceta presenta, a veces, una fijación insuficiente de nitrógeno y síntomas de deficiencias del mismo en plantas inoculadas (Burton y Curley 1968; Sims *et al.* 1968). Sheehy y Popple (1981) lo han relacionado con un mayor requerimiento de fotosíntesis bruta con respecto a la alfalfa, 258 kg CH<sub>2</sub>O/(ha/día) vs 234,3 kg CH<sub>2</sub>O/(ha/día), respectivamente. Esta diferencia en requerimiento de cantidades de energía se puede explicar por el menor índice de área foliar (LAI, leaf area indice) de la esparceta, el cual es la mitad del LAI de la alfalfa. La esparceta tiene menor capacidad de aprovechamiento de la luz y de fijación del carbón, lo que puede afectar a la fijación del nitrógeno. Ello puede explicar también su alta actividad nodular y el elevado peso de sus nódulos, en comparación con el que presentan otras leguminosas, con el fin de compensar una posible limitación de la fijación.

### III.4. Abonado

La respuesta al abonado en la esparceta es variable según diversos autores. Koter (1965) apreció que la fertilización con nitrógeno mineral a altos niveles tuvo un efecto inhibitor sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno mientras que niveles bajos la estimularon. Meyer (1975) observó, sin embargo, que el aporte de nitrato dio como resultado un aumento de la producción; según Sims *et al.* (1968) la producción aumentó del 20 al 30% cuando la esparceta se inoculó con rizobacterias. Contrariamente, Sheehy (2008) y Badoux (1965) encontraron una ausencia de respuesta a abonos nitrogenados.

Sheehy *et al.* (1984) analizaron los nutrientes de los extractos del suelo para formular un abono adaptado a sus necesidades del cultivo de la alfalfa y la esparceta y concluyeron que la esparceta necesita más P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y NO<sub>3</sub> pero menos K<sub>2</sub>O y CaCO<sub>3</sub> que la alfalfa. Meyer (1975) apreció escasos efectos del abonado con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O sobre la producción de la esparceta mientras que Shan *et al.* (1991) encontraron un efecto positivo de los mismos abonos. Tufenkci *et al.* (2006) observaron que las aplicaciones de fósforo, nitrógeno e inóculo de rizobacterias mejoraron la producción y la asimilación de nutrientes en la esparceta.

Esta disparidad en las repuestas a fertilizantes encontrados por los autores anteriores podría deberse a la variación de los tipos de suelo. En Aragón, Delgado *et al.* (2008b) recomendaron abonados de fondo de 100 a 150 unidades de fósforo y potasio en el momento de la siembra.

### III.5. Plagas y enfermedades

La esparceta es relativamente indemne a plagas y enfermedades, en comparación con otras leguminosas como la alfalfa (Frame *et al.* 1998; Goplen *et al.* 1991).

A pesar de ello, varios insectos y nematodos parasitan la esparceta, pero rara vez se establecen como plagas. *Sitona scissifrons*, un insecto que en estado de larva se nutre de las raíces de la esparceta y en estado adulto de sus hojas, puede tener efectos devastadores, especialmente sobre las plántulas (Wallace 1968). Otras especies comen o chupan de las hojas y tallos, produciendo daños menores: *Loxostege* sp., *Colias* sp., *Phytonomus farinosus*, *Hypera trilineata*, *Empoasca fabae*, *Lygus* sp. y *Adelphocoris lineolatus* (Morrill *et al.* 1998). Las semillas atraen a otros depredadores, a veces con consecuencias importantes, como *Contarinia onobrychidis*, *Eurytoma onobrychidis*, *Perrisia onobrychidis*, *Apion pisi*, *Odontothrips intermedius*, *Otiorhynchus ligustici*, *Meligites erythropus*, *Bruchidius unicolor* y *Bruchophagous* sp. (Morrill *et al.* 1998; Wallace 1968). En Estados Unidos, los nematodos *Meloidogyne* spp. y *Ditylenchus dipsaci* han sido perjudiciales para la esparceta, principalmente en estados juveniles (Mathre 1968).

En lo que respecta a las enfermedades, se han descrito varias, de poca relevancia económica, que atacan a la raíz o a la corona. Se trata de *Sclerotinia trifoliorum*, *Verticilium albo-atrum* y de varias especies de *Fusarium*, principalmente *F. solani*, que producen podredumbre de la raíz y/o de la corona y afectan a la persistencia del cultivo (Hughes 1949; Mathre 1968). La alternancia con un cereal, un ritmo de corte adecuado y un buen drenaje pueden contribuir a reducir la incidencia de aquellas enfermedades. Otras enfermedades afectan a los tallos y hojas, como la roya (*Uromyces onobrychidis*) y el oídio (*Erysiphe polygoni*), o producen necrosis en forma de puntos o de óvalos, son *Ramularia onobrychidis*, *Septoria orobina*, *Pleospora herbarum* (*Stemphyllium botryosum*), *Aschochyta onobrychidis*, *Aschochyta fabae* o *Botrytis cinerea* (Eken 2003; Eken y Demirci 2003; Mathre 1968).

### III.6. Control de malas hierbas

La esparceta se considera un cultivo poco agresivo, con un rebrote lento, que necesita ser implantada en suelos con escasa presencia de malas hierbas, ya que éstas pueden afectar a la producción, sobre todo en el año de establecimiento. Moyer (1985) apreció que en el caso de esparceta cultivada sin herbicidas, las malas hierbas pueden llegar a alcanzar el 98% del peso del primer corte.

Una de las prácticas que se ha utilizado para reducir el impacto de las malas hierbas es la utilización de un cultivo de cobertera, pero en la actualidad también se recurre a la aplicación de herbicidas químicos. En el caso de malas hierbas de hoja ancha como *Stellaria media*, *Galium aparine*, *Chenopodium album*, *Senecio vulgaris* y *Lamium purpurum*, el MCPA [a.i. 4-(4-Chloro-2-methyl-phenoxy)acetic acid] y MCPB [a.i. 4-(4-Chloro-2-methyl-phenoxy)butyric acid] han sido utilizados con éxito en el estadio de tres foliolos de la esparceta. Carbetamina [(R)-1-(ethylcarbamoyl)ethylcarbanilate] se mostró eficaz contra gramíneas y *Stellaria media* en invierno (Frame *et al.* 1998; Sheldrick y Thomson 1982).

## IV. CARACTERIZACIÓN DE LA ESPARCETA

Como se ha mencionado en el apartado II.3, las distintas variedades de esparceta pueden ser clasificadas en tres grupos principales según su morfología y su comportamiento agronómico, común, gigante o intermedio. Los tres difieren en numerosos parámetros como el número de tallos y su altura y diámetro, el número de inflorescencias y flores, el número de foliolos por hoja, la vellosidad, el porte, la persistencia, el rebrote tras el corte, el crecimiento invernal o la producción de semilla. Sin embargo, los parámetros que tuvieron más relevancia a la hora de caracterizar las variedades de esparceta fueron la alternatividad, la precocidad, el porte, la capacidad de rebrote y la persistencia (Badoux 1965; Delgado *et al.* 2008b; Michelena 1983; Prospero *et al.* 1994).

A continuación se describen por su interés, prontitud y fácil visualización para la caracterización de una colección de esparcetas los siguientes parámetros: la alternatividad, el porte y la fecha de floración.

### IV.1. Aspectos agromorfológicos de interés para la caracterización

#### IV.1.1. Alternatividad

En los cereales y gramíneas forrajeras, la aptitud de las plantas a espigar el año de siembra se conoce con el término de alternatividad. En el caso de las gramíneas forrajeras, como el raigrás italiano, las plantas que florecen el año de siembra son más vigorosas el primer año y menos persistentes (De Haan 1955). Dicho término, aunque generalmente se aplica a las plantas de uno o dos años de duración, se ha intentado trasladar a la esparceta, dada la coexistencia dentro de la especie de los dos tipos de plantas, las que florecen y las que no florecen el año de siembra.



Históricamente, la selección practicada por el hombre en la esparceta se orientó a lograr una mayor productividad, obteniendo a partir de las originales denominadas de un corte o comunes, esparcetas de dos cortes o gigantes. Las de dos cortes florecen el primer año cuando se siembran en primavera y presentan mayor vigor a la salida de invierno, lo que permite realizar el primer corte más tempranamente y así poder efectuar dos cortes. Suelen presentar, además, tallos más altos y gruesos y menor persistencia que las de un corte (Badoux 1965).

Actualmente, se aprecia que existe un alto grado de variabilidad en lo que se refiere a la alternitud, en las plantas individuales obtenidas de semilla comercial, lo que se atribuye en parte a que es escasa la selección de variedades comerciales por parte de las casas de semillas y es frecuente el intercambio de semillas entre agricultores. Como consecuencia de ello ambos tipos de esparcetas, de uno y dos cortes, están presentes en las semillas comercializadas o en las proporcionadas por los agricultores, como ha sido puesto de manifiesto por Michelana y Hycka (1988) y por Delgado *et al.* (2008b), por lo que se les ha denominado como tipo “intermedio”.

#### IV.1.2. Porte

La plasticidad morfoagronómica de muchas especies es el resultado de su adaptación a diferentes tipos de estrés medioambientales. Así se ha puesto de manifiesto en diferentes trabajos sobre *Trifolium repens* L. (Seker *et al.* 2003), *Lotus corniculatus* L. (Drobna 2010) y *Lolium perenne* L. (Charmet *et al.* 1990). Esta plasticidad puede modificarse mediante mejora genética (Huyghe 1998; Pecetti *et al.* 2008).

La defoliación frecuente o pastoreo es un estrés inducido a las plantas, cuya tolerancia se ha relacionado con el hábito de crecimiento rastrero. Así lo han puesto de manifiesto Diaz *et al.* (2007) realizando una revisión sobre las especies en pastoreo, Landsberg *et al.* (1999) en un estudio sobre la flora pascícola que crece habitualmente en ambientes áridos y Culvenor *et al.* (2009) evaluando la tolerancia al pastoreo de diferentes poblaciones de *Phalaris aquatica* L. Sin embargo, el hábito de crecimiento rastrero no es un carácter exclusivo de las plantas tolerantes al pastoreo y otros autores han mostrado que pueden obtenerse variedades de crecimiento erecto tolerantes al pastoreo, mediante programas de mejora genética, en *Medicago sativa* L. (Pecetti *et al.* 2008), *Lotus corniculatus* L. (Ayres *et al.* 2008) y gramíneas tropicales (Wong y Stur 1996).

La esparceta es una planta que se utiliza mediante diferentes regímenes de aprovechamiento: siega, pastoreo y mixto (Benaiges 1971; Chassagne y Chambon 1993; Delgado *et al.* 2002). La esparceta crece erecta y en otoño e invierno tiende a adoptar una formación en roseta. Esta tendencia al porte rastrero durante la parada vegetativa de otoño-invierno es una característica que se ha mostrado en las alfalfas con prolongado reposo invernal (Pecetti *et al.* 2008), así como en las de crecimiento rastrero (Bagavathiannan *et al.* 2010; Ben Chaabane y Delgado 1994), lo que se ha asociado a su tolerancia al frío y al pastoreo, pero no hay referencias bibliográficas sobre la variabilidad existente en la esparceta ni sobre su tolerancia al pastoreo relacionado con el hábito de crecimiento.

### IV.1.3. Estados fenológico y fecha de floración

La época de floración de las especies que crecen en ambientes semiáridos mediterráneos presenta una gran plasticidad, estando la fecha de floración influenciada principalmente por el genotipo, la temperatura y el fotoperiodo (Iannucci *et al.* 2008).

En lo que respecta a la esparceta, existen escasas diferencias en la fecha de floración entre los diferentes tipos y variedades. Percibal (1949), (citado por Badoux 1965) encontró que la diferencias entre los tipos de uno y dos cortes oscilaba entre cinco y diez días, siendo más precoces las de dos cortes; Thomson (1951) observó que la diferencia era de cinco días, y que las más precoces eran las de un corte; Badoux (1965), mediando en esta controversia, encontró diferencias entre tres y diez días, según el año, siendo más precoces las de un corte y concluyó que las diferencias entre tipos y variedades había que atribuir las al origen de las semillas, adaptadas a diferentes medios.

Badoux (1965) mostró, asimismo, la dificultad para establecer la fecha de floración de los diferentes tipos y variedades, ya que en una misma planta podían presentarse tallos en todos los estados fenológicos y, por tanto, flores abiertas durante un largo periodo de tiempo. Las inflorescencias son, además, alargadas y están compuestas por numerosas flores, cuya apertura se inicia desde la parte inferior y va progresando hasta la parte superior, alargando el proceso, de manera que cuando se abren las últimas flores, ya se han formado vainas en las inferiores. Este proceso de formación de una infrutescencia podría durar más de 20 días dentro de una misma inflorescencia. Por ello, Badoux (1965) señaló sólo dos estados fácilmente distinguibles: la aparición de los primeros botones florales, marcado por la presencia de al menos tres botones florales en la planta, y el inicio de la floración, cuando aparecen flores abiertas en tres inflorescencias; después, la apreciación del estado fenológico se volvía muy imprecisa por lo que proponía estimar visualmente la floración mediante una escala de 1 (floración más o menos finalizada) a 9 (planta sin botones florales). Dicho autor consideraba que un cultivo está en floración cuando el 30% de las plantas presentan flores abiertas.

Borreani *et al.* (2003) abordaron, asimismo, la evolución de la producción y calidad del forraje a lo largo del primer ciclo productivo de la esparceta, en diez estadios fenológicos, en una escala de 0 (estado de roseta) a 9 (vainas virando a marrón). Los citados autores concluyeron que la codificación propuesta no era suficientemente sensible para predecir cambios bruscos en la calidad del forraje entre la aparición de botones florales y la floración, y debería ser redefinida para su utilización por técnicos y ganaderos.

Con el fin de abundar en la definición de los estados fenológicos de la esparceta y establecer criterios prácticos para la explotación del cultivo basados en la producción y calidad del forraje, Delgado *et al.* (2010a) realizaron un seguimiento del proceso de floración de plantas individuales desde la aparición de los primeros botones florales, hasta la maduración de la semilla, contabilizando el número de inflorescencias y estado fenológico de las mismas, la proporción de tallos, hojas e inflorescencias, y el contenido en proteína bruta, fibra (FND y FAD) y lignina de dichas partes. Como conclusión del estudio definieron los seis estados fenológicos siguientes:

1. Estado “botón verde”. 50% de los tallos tienen botones verdes. Aparecen las primeras inflorescencias con dos-tres flores abiertas.

2. Estado “inicio de floración”. 50% de los tallos muestran inflorescencias con al menos dos- tres flores abiertas. Aparecen las primeras inflorescencias con el 50% de las flores abiertas.
3. Estado “plena floración”. 50% de los tallos muestran inflorescencias con el 50% de las flores abiertas. Aparecen las primeras inflorescencias con flores abiertas en la parte superior.
4. Estado “final de floración”. 50% de los tallos presentan inflorescencias con flores abiertas en la parte superior. Aparecen las primeras inflorescencias con vainas formadas en la base de la inflorescencia.
5. Estado “semilla verde”. 50% de los tallos presentan vainas verdes en la totalidad de la inflorescencia y las flores han desaparecido. Aparecen las primeras vainas virando a marrón.
6. Estado “maduración de la semilla”. 50% de los tallos presentan vainas virando a marrón. Aparecen las primeras inflorescencias con sólo vainas marrones.

La principal diferencia entre las escalas fenológicas estudiadas por Delgado *et al.* (2010a) y Borreani *et al.* (2003) reside en el número de estados definidos durante el proceso de la floración. Borreani *et al.* (2003) estudiaron 10 estados a lo largo de todo el ciclo fenológico de la esparceta, pero solo identificaron dos estados durante el periodo de floración, inicio y final de floración, concluyendo que la escala utilizada no fue lo bastante sensible para describir cambios drásticos en la composición química de las plantas. La escala propuesta por Delgado *et al.* (2010b) identificó tres estados: inicio, plena y final de floración, detectándose el cambio más pronunciado en la composición química de la planta entre los estados de plena y final de floración.

#### **I V.2. Caracterización genética**

Además de la caracterización morfológica y agronómica, que es una etapa necesaria en mejora vegetal, varias herramientas moleculares son utilizadas para completar la caracterización y la identificación de las variedades de plantas. Dentro de estas técnicas, los microsatélites o “simple sequence repeats” (SSRs) se han convertido en uno de los sistemas de marcaje molecular más útiles en mejora vegetal. Los microsatélites son ampliamente empleados en la generación de ‘códigos de barras’, el estudio de la diversidad genética, la creación de mapas moleculares y la hibridación asistida por marcadores, debido a su polimorfismo alto, repetibilidad y ser codominantes.

En las leguminosas, la disponibilidad de los SSRs ha permitido progresos en la caracterización y el estudio de la diversidad genética de especies, en géneros como *Medicago* (Falahati-Anbaran *et al.* 2004). La amplificación interespecífica de SSR ha sido estudiada (Peakall *et al.* 1998) y SSR trans-amplificados han sido usados en mapas genéticos en *Trifolium repens* L., por ejemplo (Zhang *et al.* 2007). A pesar de que no hay microsatélites disponibles para la esparceta, la revisión de los SSRs identificados en *Medicago* y *Glycine* ofrecen la posibilidad de encontrar regiones similares en el genoma de *Onobrychis* que permitan una caracterización fiable y rápida del material vegetal de esparceta.

El aislamiento de microsatélites puede ser costoso en tiempo y dinero, en ausencia de abundantes secuencias de ADN publicadas en una especie, por lo que su uso se restringe a menudo, a un reducido número de cultivos agrícolas.

Sin embargo, la cantidad de SSRs identificados aumenta a un ritmo constante, especialmente en las especies-modelo de leguminosas, y el desarrollo de marcadores SSR a través de la utilización de bases de datos publicadas resulta una opción eficaz y de bajo coste para muchas especies de plantas. Una vía alternativa consiste en la utilización de *loci* de especies relacionadas (Smulders *et al.* 1997). La transferibilidad de los *loci* de SSR depende a menudo del parentesco. Mientras se han mencionado cocientes de transferibilidad interespecíficos altos dentro del mismo género (>50%) en especies de árboles (Liewlaksaneeyanawin *et al.* 2004; Wünsch y Hormaza 2002) y en las leguminosas (Eujayl *et al.* 2004; Gaitán-Solís *et al.* 2002; Peakall *et al.* 1998), la transferibilidad entre géneros y más allá parece ser menor (Peakall *et al.* 1998; White y Powell 1997). Por otra parte, SSRs identificados en marcadores ESTs (EST-SSR) muestran cocientes de transferibilidad más altos y tienden a ser más conservados que los marcadores genómicos de SSR (Scott *et al.* 2000). De momento no se han aislado microsatélites en la esparceta.

## V. OPTIMIZACIÓN DEL APROVECHAMIENTO DEL CULTIVO

### V.1. Régimen de aprovechamientos

La frecuencia del régimen de aprovechamientos en las leguminosas ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación. En una revisión de dichos trabajos sobre la alfalfa (Sheaffer *et al.* 1988), el trébol violeta (Wiersma *et al.* 1998), el trébol blanco (Simon *et al.* 2004) y el loto (Flaresso y Desaibro 1992), se aprecia que cuando se sobrepasa la frecuencia óptima del aprovechamiento se produce un agotamiento de las reservas, una caída de la producción y una pérdida de persistencia. No obstante, el techo crítico no es el mismo para todas las especies, algunas como el trébol blanco, se acomodan mejor a los aprovechamientos frecuentes que la alfalfa o el loto.

En lo que respecta a la esparceta, se han abordado diferentes trabajos para determinar la distribución anual de los aprovechamientos más favorable para alcanzar el óptimo de producción, calidad y persistencia. La fecha del primer aprovechamiento más adecuada para contribuir a obtener dicho óptimo ha sido abordada por Carlton *et al.* (1968), Koch *et al.* (1972), Borreani *et al.* (2003) y Delgado *et al.* (2010a). En dichos experimentos se estudió la evolución de la producción y calidad del forraje desde el estado de botón floral hasta la formación de semillas. Los citados autores apreciaron un aumento de la producción y una disminución de la calidad, especialmente del contenido en proteínas con el envejecimiento de la planta, estableciendo que el momento más favorable para realizar el primer corte se localiza entre el inicio de la floración y la plena floración.

El aumento de la producción se atribuyó a la mayor contribución porcentual de los tallos a medida que envejece la planta, a lo que se añade la aportación de la masa de inflorescencias. Con la progresión de la floración, la relación hoja/tallo decae rápidamente y con ello, la pérdida de calidad (Koch *et al.* 1972; Pardo *et al.* 2000; Borreani *et al.* 2003).

A partir del primer corte tienen lugar uno o varios rebrotes estivales, en función de la humedad disponible (Delgado *et al.* 2008b). Badoux (1965) apreció diferencias varietales en la capacidad de rebrote. En lo que respecta a uniformidad en el crecimiento; las variedades de dos cortes florecían regularmente después de cada aprovechamiento hasta el otoño, mientras que en las de un corte la floración decaía rápidamente después del primer aprovechamiento. Badoux (1965) observó, asimismo, que un ritmo frecuente de aprovechamientos en verano no influía en la tendencia a florecer, pero frenaba la capacidad de rebrote del cultivo al año siguiente, afectando por igual a ambos tipos de esparceta sin importar su alternabilidad. Un rebrote vigoroso a la salida de invierno sería aconsejable para alcanzar una buena producción y competencia contra las malas hierbas invasoras.

En otoño e invierno, el cultivo permanece siempre verde. En este periodo, según Badoux (1965), la intensidad del aprovechamiento tiene escasa influencia sobre la pérdida de rendimiento del año siguiente al contrario de lo que recomiendan Sheaffer *et al.* (1988) en otros cultivos como la alfalfa, cuya intensidad en los aprovechamientos es determinante. Ello lo atribuye Badoux (1965) a que el peor reparto anual de la producción en la esparceta, con escaso crecimiento en verano-otoño y poca aptitud a formar tallos fértiles en otoño, hace que el agotamiento de sus reservas sea inferior.

Existen diferencias varietales en producción y calidad del forraje, en función del régimen de aprovechamientos (Badoux 1965). Los aprovechamientos frecuentes inciden negativamente en la producción total de MS, pero las esparcetas de un corte sufren menos con los cortes frecuentes que las de dos cortes, lo mismo en plantas aisladas que en siembra densa. Ello repercute en el contenido en proteína bruta del forraje que es mayor en aprovechamientos frecuentes que en normales. Sin embargo, la producción total de PB (en cantidad) es inferior en aprovechamientos frecuentes, dado que es menor la producción de MS. En lo que respecta a las diferencias varietales, la calidad en las esparcetas de un corte sigue siendo superior, lo mismo en contenido en PB que en fibra bruta, que es menor que en variedades de dos cortes (Badoux 1965).

## V.2. Movilización de reservas

Al igual que sucede en otras leguminosas como la alfalfa (Sheaffer *et al.* 1988) y el trébol blanco (Simon *et al.* 2004), la esparceta acumula reservas nutritivas en la corona y raíces en forma de azúcares solubles y proteínas, que utiliza para desarrollar el rebrote aéreo y la renovación de raíces, cuando tienen lugar aprovechamientos de forraje o paradas vegetativas como consecuencia de las altas o bajas temperaturas (Badoux 1965). En lo que respecta a la esparceta, Badoux (1965) observó que el régimen de aprovechamientos afectaba al peso de las raíces. Después de cada aprovechamiento, la masa de raíces sufría una disminución del peso y hasta que no había un cierto crecimiento aéreo, no retomaban activamente su recuperación. Ello lo atribuyó a que las reservas de las raíces se movilizan para desarrollar el rebrote aéreo de las plantas y futuras raíces. La producción de raíces fue mayor cuanto más moderado fue el régimen de aprovechamientos y las reservas menores cuanto más intenso fue aquel; consecuentemente, los aprovechamientos frecuentes redujeron la producción de raíces y de reservas. En cualquiera de las situaciones, la mayor masa de raíces se alcanzó al final del otoño. En invierno había una pérdida en el contenido de reservas de las raíces dado que, cuando las condiciones climatológicas eran favorables, no había un reposo invernal propiamente dicho y la planta seguía creciendo. Pardo *et al.* (2000) también apreciaron que, eventualmente, puede tener lugar un crecimiento invernal si las temperaturas lo permiten.

Mowrey y Matches (1991), estudiando el menor crecimiento de la esparceta en verano, apreciaron, asimismo, que la concentración de carbohidratos en las raíces era mas elevada al inicio de la primavera, descendía fuertemente en verano y volvía a ascender en otoño.

En lo que respecta a la acumulación de reservas de las raíces, Badoux (1965) apreció diferencias entre los dos tipos de esparcetas; el peso de las raíces fue mayor en las de un corte que en las de dos cortes; la pérdida de peso por efecto del régimen de cortes fue, asimismo, menor en las de uno que en las de dos cortes, todo lo cual puede contribuir a prolongar la persistencia de las esparcetas de un corte.

Frame *et al.* (1998) mencionan la importancia de un periodo de descanso al final de otoño, para permitir a las plantas establecer las reservas necesarias para su supervivencia durante el invierno y para el inicio del crecimiento en primavera. Una vez que las plantas entran en estado de latencia, se pueden pastorear sin peligro.

Cunningham *et al.* (2001) constataron, en alfalfas, un aumento de las concentraciones en azúcares libres y PB en las raíces, como repuesta a una selección realizada hacia tipos presentando una mayor latencia invernal y tolerancia al frío.

Li *et al.* (1996) realizaron un seguimiento de cuatro especies de leguminosas, alfalfa, meliloto, loto y trébol, durante el invierno y tras el último corte. Las distintas especies presentaron estrategias de acumulación/reposición distintas: la alfalfa y el trébol presentaron niveles altos de acumulación de almidón, dos semanas después del corte. El meliloto almacenó hasta el doble de azúcares libres que las demás especies, durante el periodo invernal, mientras la alfalfa presentó niveles superiores de nitrógeno. La alfalfa acumuló durante el invierno tres polipéptidos y una  $\beta$ -amilasa en cantidades importantes hasta marzo. Todas las especies presentaron un polipéptido de 17kDa presente únicamente en invierno y posiblemente asociado con la resistencia al frío.

Del mismo modo, Teixeira *et al.* (2007) encontraron acumulación de almidón en invierno o después del corte en alfalfa. El rango de concentración de almidón fue menor que el rango de los azúcares. Las concentraciones en azúcares y almidón variaron a la vez con el peso de las raíces y coronas, dando lugar a variaciones importantes de la cantidad de las reservas, vinculadas a los cortes o a los cambios de estación. Sin embargo, el mejor indicador del crecimiento en primavera fue la cantidad de nitrógeno radicular. Se estima que el 35% del nitrógeno radicular de las plantas es utilizado para la formación y crecimiento inicial de los brotes (Kim *et al.* 1991). Estos últimos autores estudiaron el ciclo del nitrógeno en alfalfa con moléculas marcadas, llegando a la conclusión de que, durante los diez días siguientes al corte la casi totalidad del nitrógeno de los tallos y hojas en formación está provisto por las reservas en nitrógeno de la corona y de la raíz; después de 24 días, todavía el 31% de nitrógeno provenía de las reservas. Dichos autores, señalan así mismo, que el corte, aparte de remover el nitrógeno contenido en los tallos y hojas, tiene un efecto depresivo sobre la absorción y la asimilación de nitrógeno, ya sea mineral o fijado. Este efecto negativo se explica por la reducción de la actividad de enzimas como la nitrato reductasa o la nitrogenasa, así como por su consumo en el seno de la raíz, por respiración. Simon *et al.* (2004) trabajando con trébol blanco obtuvieron resultados semejantes a los autores anteriormente citados; en su caso establecieron que el tipo de trébol enano presenta una mayor plasticidad ya que su nivel de reservas muestra mayores variaciones a lo largo del año. El tipo gigante, al tener mayor capacidad de almacenamiento, su potencial de rebrote fue mayor.

### V.3. Altura de la defoliación

Para determinar el régimen de aprovechamientos, algunos autores han estudiado la combinación de diferentes referencias: estado fenológico de la planta, altura del follaje a la que se lleva a cabo la defoliación y altura del rastrojo que queda tras la misma, para establecer el momento óptimo del aprovechamiento.

Mowrey y Matches (1991) realizaron aprovechamientos con tres intensidades de defoliación de la parte aérea, rastrojo a 5 cm, siega al 50% y al 75% de la altura del follaje, en tres estados fenológicos: botón floral, plena floración y semilla verde. Apreciaron una pérdida de producción y de persistencia cuando se combinaban aprovechamientos en botón floral o plena floración con la intensidad de defoliación más elevada, pero los efectos se reducían considerablemente con bajas y medias intensidades de defoliación.

Mowrey y Volesky (1993) no apreciaron ninguna pérdida de persistencia con aprovechamientos en inicio y plena floración y defoliaciones comprendidas entre el 50 y 75%.

Maiorana *et al.* (1995) observaron, realizando siegas cada vez que el follaje alcanzaba 10, 15 y 20 cm de altura y efectuando los cortes a ras del suelo o a 5 cm, que las mejores producciones se obtenían con siegas de plantas a 15 cm de altura y practicadas a ras del suelo.

De Giorgio *et al.* (2000) observaron que con aprovechamientos a 20 cm de altura la distribución del grueso de las raíces tenía lugar en la parte superficial del suelo, mientras que si se realizaban a 10 cm, las raíces se localizaban a mayor profundidad.

De Falco *et al.* (2000), comparando el aprovechamiento tradicional de la esparceta, siega en plena floración y un aprovechamiento estival del rebrote, frente a una siega cada vez que se alcanzaban los 30 cm de altura, obtuvieron la mayor producción de MS con el régimen tradicional y la de PB con la siega a 30 cm de altura.

### V.4. Distribución anual de la producción de forraje

Como se ha expuesto anteriormente, el reparto del forraje en la esparceta es más estacional, en comparación con otros cultivos análogos como la alfalfa (Delgado *et al.*, 2006; Delgado *et al.* 2008b). Diversos autores lo atribuyen a la cualidad de su acomodación a los climas fríos y semiáridos, debido a que concentra la producción de forraje en primavera, cuando es más eficiente el uso de la humedad del suelo y de la radiación incidente (Benaiges 1971; Cooper 1972; Delgado *et al.* 2008b; Frame *et al.* 1998; Koch *et al.* 1972; Montserrat y Capdevilla 1964).

Kallenbach *et al.* (1995), estudiando las causas por las que es menor la producción estival, sugirieron que ello podría deberse al alargamiento de la duración del día. En sus estudios, sometiendo las plantas a días cortos y largos, observaron que los días largos afectaban al hábito de crecimiento de las plantas, ocasionando mayor altura y producción de órganos reproductivos, pero no apreciaron que el descenso de la producción, la pérdida de reservas y la mortalidad de las plantas que tiene lugar en verano, pudiera atribuirse exclusivamente al alargamiento del día y sugirieron la influencia de otros factores como el incremento de la temperatura del aire y del suelo. Estudios posteriores (Kallenbach *et al.* 1996) mostraron que el incremento de la temperatura del aire de 15 a 35°C y del suelo de 10 a 30°C, hacían decrecer el peso de la corona y de las raíces hasta un 98%.

La concentración de carbohidratos en la corona estuvo correlacionada negativamente con el incremento de la temperatura del aire. Dicho incremento se correlacionó, asimismo, positivamente con la tasa de mortalidad de las plantas, si se efectuaba una defoliación severa durante el periodo de altas temperaturas, dado que la elevada actividad metabólica no podía ser suplida con las reservas presentes en raíces y hojas. De Falco *et al.* (2000) también apreciaron que el incremento de temperaturas al inicio en verano ocasionaba un descenso en la formación de tallos y en la producción de MS.

El reparto anual de la producción fue estudiado en Aragón, en condiciones de secano y regadío. Los resultados obtenidos mostraron un reparto similar de la producción anual de forraje en ambas condiciones, siendo en secano de 66,9%, 21,4% y 11,7% en el primero, segundo y tercer cortes, y en regadío de 67,2%, 19,4%, 9,9% y 3,5% en el primero, segundo, tercer y cuarto cortes, respectivamente (Delgado *et al.* 2008b).

## V.6. Persistencia

El balance de reservas nutritivas en la corona y raíces se encuentra entre las causas últimas de la producción y persistencia de las plantas. Mowrey y Matches (1991) estudiaron la persistencia de un cultivo de esparceta en regadío, en función del régimen de defoliaciones, concluyendo que las defoliaciones ligeras y moderadas, 52% y 69% de la masa aérea total, realizadas en los estados de botón floral y plena floración, podrían realizarse sin afectar gravemente a la persistencia del cultivo. Koch *et al.* (1972) concluyeron que la defoliación en estados precoces de la floración, reduce ligeramente la persistencia; si el primer corte de primavera se hace en floración, el régimen del resto de los cortes apenas influye en las reservas y en la persistencia de la planta.

Las esparcetas de un corte tienden a persistir más con defoliaciones frecuentes. Las razones de su mayor tolerancia a las defoliaciones frecuentes puede deberse a razones morfológicas, debido a la disposición de los órganos de asimilación que son afectados en menor medida por el corte, y fisiológicas, el consumo energético es menor y la acumulación de reservas mayor (Badoux 1965; Cooper 1972; Thomson 1951).

## VI. PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL FORRAJE

### VI.1. Producción de materia seca

Dependiendo de las condiciones ambientales, la producción de MS de la esparceta varía de 2,5 t/ha a 15 t/ha. El estado fenológico en el cual siega influye sobre el nivel de producción, oscilando la MS producida en el primer corte de 0,5 t/ha a 8 t/ha de un estado vegetativo precoz al final de floración (Borreani *et al.* 2003). El aumento de la producción va unido a una merma de la calidad de forraje; sin embargo, ésta última es limitada en el caso de la esparceta, ya que la planta mantiene sus hojas en estados avanzados de desarrollo, al contrario de la alfalfa. Debido a ello, los contenidos en fibra, lignina y proteína se mantienen relativamente estables desde el inicio al final de la floración (Mowrey y Matches 1991) por lo cual se aconseja los estados plena o final de floración para conseguir las mejores producciones de MS (Goplen *et al.* 1991).



El nivel de producción de la esparceta es aproximadamente un 20% menor que el de la alfalfa, lo que se explica por su índice de área foliar menor, ya que dispone de una estructura de la parte aérea menos erecta y una fijación de nitrógeno menos eficiente (Frame *et al.* 1998).

La fecha de siembra tiene también una repercusión importante sobre la producción de MS; en Inglaterra la producción varió de 5,17 t/ha a 13,58 t/ha en el primer año productivo según que la siembra tuviera lugar de abril a septiembre, siendo mayo el mes el más propicio en sus condiciones (Liu *et al.* 2008).

En Aragón y en condiciones de secano, el nivel de producción se ve principalmente afectado por la disponibilidad de agua como se puede apreciar en la **Tabla VII.1**, que presenta los datos de distintos ensayos realizados en la región (Delgado *et al.* 2008a).

**Tabla VI.1.** Producción de alfalfa y de esparceta en secano en distintas localidades de Aragón

Localización	Años	Altitud	Lluvia	Alfalfa		Esparceta	
				Nº de cortes al año	kg MS/ha	Nº de cortes al año	kg MS/ha
Marracos (Z)	1979-80	450	493	3	6321	2	2820
Pancrudo (TE)	1979-81	1200	426	3	5714	3	4649
Fortanete (TE)	2002-2004	1350	482	3	5538	3	4495

## VI.2. Parámetros de calidad del forraje

Los rumiantes se caracterizan por disponer de un sistema complejo de estómagos que permiten el contacto prolongado entre en los alimentos ingeridos y una rica flora de microorganismos con el fin de favorecer la fermentación de los primeros y su mejor aprovechamiento por el rumiante. De hecho, los microorganismos ruminales son capaces de degradar las fibras constituyentes de las paredes celulares vegetales, haciendo disponible para los rumiantes la energía contenida en alimentos fibrosos como los forrajes (Jarrige *et al.* 1995). La calidad de un forraje depende, aparte del contenido en PB, del nivel de degradabilidad de las fibras que lo componen o sea, en último término, de la composición de las mismas (Akin 1982).

### VI.2.1. Composición química de la pared celular

Las células vegetales que se encuentran en todo tipo de plantas, y mayormente en las plantas forrajeras, están constituidas por una pared celular que encierra el citoplasma. El citoplasma contiene el núcleo, orgánulos, vacuolas, etc., necesarias para el buen funcionamiento de la célula; su composición química es bastante estable, al contrario de lo que ocurre con la pared celular.

La pared celular vegetal es una pared rígida compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Se organiza en tres láminas principales que son la pared celular primaria, la secundaria y la laminilla media.

La pared celular primaria se forma en las fases precoces del desarrollo de la célula a partir de celulosa, hemicelulosa y péptidos. A continuación tiene lugar la formación de la pared secundaria, rígida, compuesta de celulosa, hemicelulosa y lignina. Por último, la laminilla media se sitúa entre dos células, es una membrana flexible compuesta de pectinas.

La estructura de la pared celular es relativamente constante, se trata de una red de microfibrillas de celulosa incluida en una matriz amorfa de polisacáridos; su composición cambia entre láminas pero también según los órganos de la planta, su edad, etc.

Los componentes de la pared celular se especifican por su fraccionamiento químico (solubilidad en diversos solventes) y su estructura química.

#### **VI.2.1.a Celulosa**

Se trata de un polisacárido constituido exclusivamente de D-glucosa unida mediante enlaces  $\beta(1 \rightarrow 4)$  cuya fórmula empírica es  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , siendo n muy variable y por encima de 200. Tiene una estructura lineal o fibrosa, las cadenas establecen puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos, lo que confiere solidez e impermeabiliza a las fibras, haciéndolas insolubles en agua. La celulosa se sintetiza a lo largo de todo el crecimiento celular, siendo su concentración más elevada en la pared secundaria. Hace la función de soporte de la célula, dado que confiere solidez y dureza a los tejidos vegetales. Su degradación en el rumen por microorganismos, libera moléculas de glucosa aprovechables por el animal.

#### **VI.2.1.b Hemicelulosas**

Se trata de heteropolisacáridos ramificados compuestos principalmente por glucosa, fructosa y galactosa, unidos por enlaces  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . Presentan un grado de polimerización inferior al de la celulosa, con la cual pueden asociarse estrechamente. Las hemicelulosas permiten el enlace de pectinas y confieren flexibilidad y elasticidad a la pared celular.

#### **VI.2.1.c Pectinas**

Se trata de un grupo de poliósidos ácidos o neutros que forman gel en el agua. Las pectinas se componen de homogalacturonanos (cadenas de residuos de ácido D-galacturónico en enlace  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ), ramnogalacturonano I (cadenas de ácido D-galacturónico asociado a ramnosa, arabinosa y galactosa) y ramnogalacturonano II (cadenas de estructura compleja de ácido D-galacturónico asociado a ramnosa, arabinosa, galactosa y azúcares pocos frecuentes). Las pectinas forman un cemento entre las células, localizándose principalmente en la laminilla media; llegan a constituir el 30% del peso de la pared celular.

#### **VI.2.1.d Lignina**

El principal compuesto fenólico estructural es la lignina, un polímero de elevado peso molecular, resultado de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico principalmente). Debido a su estructura compleja y a su heterogeneidad, se trata de una clase de polímeros aromáticos más que de un compuesto dado. Está presente en la pared secundaria principalmente, a la cual confiere resistencia mecánica y a la degradación. De hecho, la lignina no se digiere ni se absorbe, tampoco es atacada por la microflora del rumen, y es capaz de formar complejos con compuestos orgánicos; ello conlleva que su presencia afecte a la digestibilidad de la fibra. El grado de lignificación aumenta con el desarrollo fenológico de las plantas.

#### **VI.2.1.e Proteínas**

Las proteínas de la pared celular son proteínas ricas en prolina, glicina o hidroxiprolina (extensina); la mayoría tienen una estructura fibrilar y forman una red que enlaza con las fibras o entre ellas. A este tipo de proteínas hay que añadir otras, solubles, implicadas en el metabolismo de la pared o en el transporte.

## VI.2.2. Taninos

Los taninos son polifenoles con una masa molecular hasta de 20.000 Da (Hagerman 2002). Se dividen en dos clases, los taninos hidrolizables (TH) y los taninos condensados (TC). Los TH son poliésteres formados por un azúcar, generalmente glucosa, y un ácido fenólico de peso molecular relativamente bajo, de 600 a 3000 Da. Dependiendo del ácido fenólico, se trata de taninos gálicos, a base de ácido gálico, o de taninos elágicos, a base de ácido hexahidrofénico. Como indica su nombre, son susceptibles a la hidrólisis ácida, sobre todo en el tracto digestivo de los rumiantes, donde el producto de su degradación puede ser absorbido ocasionando, a veces, intoxicaciones graves (Jean-Blain 1998).

Los TC son polímeros de flavan-3-oles con enlace carbono-carbono de tipo 4→8 o 4→6, no hidrolizables, pero que en presencia de ácido y calor dan lugar a antocianidinas coloradas. Varias leguminosas forrajeras como la zulla (*Hedysarum coronarium*), los lotos (*Lotus* sp) y la esparceta, contienen TC en cantidades significativas, del orden del 2 al 5 % de la MS. En el caso de estas especies, los TC no están acumulados en unos tejidos determinados (epidérmicos o sub-epidérmicos, cortezas de frutas o raíces, etc.), sino que las células taníferas se encuentran esparcidas por la planta (Skadhauge *et al.* 1997). A nivel celular, los TC se ubican libres principalmente, acumulados en vacuolas intracelulares, y una proporción variable ligados a fibras (lignina) de la pared celular o a proteínas celulares (Terrill *et al.* 1992b). El contenido y la composición de los TC cambia con la edad de la planta (Koupai-Abyazani *et al.* 1993), siendo la aptitud a formar complejos mayor en plantas jóvenes (Bate-Smith 1973). Parte de los taninos son catabolizados durante el envejecimiento en la esparceta (Lees *et al.* 1995).

Los taninos, en función de su grado de polimerización, son parcialmente solubles en agua, acetona y alcoholes; el rendimiento de su extracción es óptimo con soluciones acetona-agua o butanol-agua (Makkar 2000).

La principal propiedad de los taninos reside en su capacidad para formar complejos con macromoléculas, proteínas, polisacáridos o lignina, así como con iones metálicos, debido a sus grupos hidroxilos y fenólicos (Mueller-Harvey y Mc Allan. 1992). La formación de complejos entre taninos y proteínas, tanto proteínas estructurales como enzimas, produce astringencia y disminuye la sensibilidad a la degradación enzimática de los tejidos ricos en taninos protegiéndolos contra la acción de herbívoros, hongos y bacterias. En la alimentación de rumiantes, los TH pueden dar lugar a intoxicaciones severas, mientras que los TC se consideran menos nocivos. La inclusión de cantidades moderadas de TC en la dieta de rumiantes (inferior al 5% de la MS) ha sido considerada como beneficiosa (Min *et al.* 2003; Waghorn y Mc Nabb 2003). A este nivel de concentración, la capacidad de ingestión de los alimentos no se ve afectada (Terrill *et al.* 1992a) e, incluso, se observa una protección de las proteínas frente a la degradación ruminal. De hecho, el rumen presenta un pH entre 6 y 7; en este intervalo de pH, los TC forman complejos estables con las proteínas lo que contribuye, por una parte, a la protección de las proteínas alimentarias; por otra, la formación de complejos con las enzimas bacterianas reduce su capacidad de degradación, lo que acaba reduciendo finalmente la proteólisis ruminal (Min *et al.* 2003; Theodorou *et al.* 1999). El resultado inmediato es la limitación de la producción de metano y amoníaco (Mc Nabb *et al.* 1993; Theodorou *et al.* 1999).

El segundo efecto es el tránsito de las proteínas alimentarias no degradadas del rumen al abomaso, donde el cambio a pH ácido provoca la disociación de los complejos TC-proteínas reversibles y la liberación de las proteínas para su digestión a nivel intestinal, dando lugar a una mayor asimilación de los aminoácidos (Mc Nabb *et al.* 1993; Min *et al.* 2003; Theodorou *et al.* 1999). Este proceso favorece también la liberación del nitrógeno excretado de forma menos perjudicial para el medio ambiente, ya que disminuye el contenido en nitrógeno de la orina y aumenta el de las heces (Min *et al.* 2003).

El consumo de forraje con niveles moderados de TC ha tenido un efecto positivo sobre el crecimiento de corderos (Mc Nabb *et al.* 1993; Ramirez Restrepo y Barry 2005; Waghorn y Mc Nabb 2003) y de terneros (Moore *et al.* 2003), así como sobre la producción y calidad de la leche (Min *et al.* 2003; Waghorn y Mc Nabb 2003).

### **VI.2.3. Técnicas de medida del valor nutritivo de la esparceta**

Los distintos órganos de la planta tienen un peso desigual sobre el valor nutritivo del forraje; así, las hojas presentan elevados contenidos en proteínas necesarias para la actividad fotosintética, mientras que los tallos muestran niveles más altos de lignificación y, por tanto, de fibras. Sin embargo, el fraccionamiento de la planta no es el único criterio para realizar una estimación rigurosa del valor nutritivo del forraje, ya que éste depende también del estado fenológico, del estado sanitario y de la edad de los tejidos (Theander y Aman 1984).

El análisis químico de la planta permite abstraerse de estas contingencias. Van Soest y Wine (1967) desarrollaron, mediante ataques químicos, un método de separación de los componentes de la pared celular, en fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD). Este fraccionamiento corresponde al total de los contenidos de la pared celular (FND), de la célula más lignina (FAD) y de la lignina (LAD). Dichas determinaciones, asociadas a la medición de los contenidos en PB y en taninos, permiten acercarse al valor nutritivo de la esparceta.

### **VI.3. Factores que afectan a la calidad del forraje**

Los principales factores que influyen sobre el valor nutritivo de los forrajes son las condiciones medioambientales, las prácticas culturales, la variedad y el ciclo (o rango del corte), siendo el estado fenológico el factor con mayor peso según Buxton (1996). En la **Tabla VI.3** se presentan los valores de composición química y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica de la esparceta en diferentes estados fenológicos (INRA 2007).

El desarrollo fenológico de la esparceta en el primer ciclo tiene lugar aproximadamente en mes y medio; durante el cual, la proporción de hojas pasa de ser el 90 % en estado vegetativo al 15 % en estado de floración para mantenerse estable en los últimos estados, según Borreani *et al.* (2003), aunque los porcentajes pueden variar en función de la densidad de plantas; Delgado *et al.* (2010b) observaron en plantas distanciadas porcentajes de hojas sobre el peso total de la planta que variaban del 45% en estado de botón verde al 32% en inicio de maduración. El descenso en la proporción de hojas se debe principalmente al aumento inicial de la cantidad de tallos y de tallos e inflorescencias posteriormente. La evolución decreciente del contenido en PB que acompaña al envejecimiento de la planta, se debe principalmente al incremento de la proporción de tallos, los cuales presentan un menor contenido en PB (Bal *et al.* 2006; Borreani *et al.* 2003).

Sin embargo el contenido en lignina relativamente bajo de las plantas dentro de las leguminosas, entre el 7 y el 10 % de LAD, permite mantener una digestibilidad elevada (Koch *et al.* 1972).

**Tabla VI.3.** Contenido (%) en materia seca (MS), proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD), digestibilidad in vitro de la materia orgánica (DMO) de la esparceta en diferentes estados vegetativos (INRA 2007)

	MS	FND	FAD	DMO	PB
Aparición de botones	13,0	41	23	79	18,4
Botón floral	13,5	45	28	75	15,9
Inicio de floración	14,2	50	32	71	14,3
Plena floración	17,0	54	36	67	13,1
Final de floración	21,7	57	39	62	13,3

## VII. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y PRODUCCIÓN DE SEMILLA

### VII.1. Biología reproductiva de la esparceta

La esparceta, por su pertenencia a la familia de las *Fabaceae*, se caracteriza por tener una flor zigomorfa y hermafrodita. El perianto está compuesto por un cáliz gamosépalo, reducido a 5 dientes, mientras la corola exhibe un pétalo dorsal muy desarrollado que es el estandarte, dos pétalos laterales que constituyen las alas y son de tamaño muy reducido en el caso de la esparceta, y dos pétalos unidos por sur parte inferior que forman la quilla, la cual envuelve al androceo y gineceo. El androceo está compuesto por diez estambres, 9 de los cuales forman un canalón fusionado salvo por el tercio apical, orientado hacia arriba con un ángulo de 80°-90° con respecto al tubo, y el último, separado y levemente más corto, cubre la parte abierta del canalón. El pistilo está colocado entre los estambres y conduce al gineceo, compuesto de un carpelo, formando un ovario súpero, oval, conteniendo un óvulo único.

La polinización de la esparceta, o sea el transporte del gametofito masculino binucleado a la superficie del estigma, es entomófila, y los insectos visitan las flores por el néctar. El encuentro con el polen se hace en el estigma, que en la esparceta es húmedo, glabro, capitado, mucilaginoso y rodeado de papilas largas (Valdés 2000). En los estigmas de tipo húmedo, la superficie secreta un exudado compuesto por lípidos y proteínas, esterases no específicas y fosfatasas ácidas produciendo una textura viscosa (Gosh y Shivanna 1982; Shivanna y Owens 1989). Este exudado está protegido por una cutícula hasta su ruptura, que sobreviene en general con la polinización (Rodríguez-Riaño *et al.* 1999). A pesar de que el estigma puede estar receptivo en las *Fabaceae* antes de la liberación del exudado, incluso antes que la antesis, el exudado desempeña un papel fundamental en la hidratación y la germinación del polen (Shivanna y Owens 1989). La ausencia de fluido libre antes de la polinización podría ser una estrategia para minimizar la adherencia del polen propio (De las Heras *et al.* 2001; Shivanna y Owens 1989). La presencia de esta cutícula se ha comprobado en la esparceta (Galloni *et al.* 2007).

Después de la polinización, la liberación de los exudados permite la captura del polen, su adhesión, hidratación y germinación, así como la penetración y el crecimiento del tubo polínico. El desarrollo correcto de esta secuencia implica un intercambio continuo de señales entre el polen y el pistilo (Hiscock y Allen 2008) y constituye uno de los principales escollos de la fase reproductiva (Rodrigo y Herrero 2002).

El tubo polínico crece a través del estilo, que en el caso de las *Fabaceae* es intermedio entre hueco y sólido. El tejido transmisor une el estigma al ovario y provee los nutrientes necesarios al crecimiento del tubo polínico. Durante este proceso, tiene lugar una competición entre los tubos polínicos en su carrera hacia el óvulo. Este último guía los tubos polínicos por quimiotropismo, hacia el micropilo, a través del cual accederán a la nucela y al saco embrionario donde tendrá lugar la fecundación (Herrero 2001). El pistilo desempeña un papel crucial en la selección y la competencia del polen, así como en el establecimiento de un sistema de incompatibilidad (Heslop-Harrison 1975; Hormaza y Herrero. 1996).

De hecho, el buen desarrollo del proceso que lleva de la polinización a la fecundación, requiere que el grano de polen sea compatible con la flor que lo recibe. En numerosas especies, las plantas tienden a rechazar el polen con la misma dotación genética, con el fin de favorecer la mayor heterocigosidad. En las *Fabaceae* existe una clara segregación entre las especies anuales, autocompatibles, y las especies perennes, autoincompatibles. El mecanismo de autoincompatibilidad preponderante en las *Fabaceae* es el sistema gametofítico, común en *Solanaceae*, *Rosaceae* y *Poaceae*. En este sistema, basado en interacción entre proteínas del gametofito masculino haploide y del estilo femenino diploide, el grano de polen incompatible es capaz de germinar, pero el crecimiento del tubo polínico se detiene a la mitad del estilo (Linskens y Konar 1965). Según Thomson Jr (1938), la esparceta presenta un bajo nivel de autocompatibilidad, del orden del 5%.

No existen referencias del mecanismo utilizado en lo que respecta a la esparceta. En la alfalfa se observó un alto nivel de autoincompatibilidad, ocasionado por la parada de los tubos polínicos incompatibles a la mitad del estilo, por la desorientación de los tubos en el ovario donde fallaron para encontrar el micropilo y por la mortalidad más elevada que presentaron los embriones endogámicos (Brink y Cooper 1938).

## VII.2. Producción de semilla

La esparceta produce de 5 a 40 tallos, con 3 a 5 inflorescencias por tallo y cada inflorescencia lleva de 5 a 80 flores. El número de flores por inflorescencia, de inflorescencia por tallo florecido o de tallos florecidos por planta ha sido correlacionado con factores medioambientales y genéticos (Wiesner y Carleton 1968). Los mismos autores apreciaron un aumento del tamaño de las semillas a medida que se reducía el número de flores por inflorescencia.

Cada flor produce potencialmente una semilla, pero en el mejor de los casos, solo el 55% cuajará, lo que se explica por limitaciones genéticas y fisiológicas (Goplen *et al.* 1991). Las abejas (*Apis mellifera*) y los megaquílidos (*Megachile sp*) son polinizadores eficaces de la esparceta, ya que la flor, de mayor tamaño que la de la alfalfa, puede soportar el peso de la abeja que recoge el néctar apoyándose sobre la quilla de la flor y recibe así el polen (Wallace 1968). Se aconseja la instalación de 2 ó 3 colmenas o de 20000 megaquílidos por hectárea para optimizar la polinización (Goplen *et al.* 1991).

Wiesner *et al.* (1968) constataron que el tamaño de las semillas aumenta cuando se reduce el número de semillas por inflorescencia. Martiniello y Ciola (1994) observaron un aumento de la producción de semilla en respuesta a aportes hídricos debido al aumento del peso de 1000 semillas, del número de semillas por inflorescencia y del número de inflorescencias por tallo.

La floración es escalonada y dura cerca de 60 días; la fecha de inicio está sujeta a las condiciones ambientales (de media, inicio de mayo en España, inicio de junio en Canadá, Inglaterra etc.) (Delgado *et al.* 2010a; Goplen *et al.* 1991). Las flores se abren partiendo de la base al ápice de la inflorescencia; la floración se prolonga durante 20 días y las semillas maduran en el mismo orden que se han abierto las flores. Ello conlleva que las semillas de la base maduren antes que las del ápice y empiezan a caerse. La recolección debe, por tanto, efectuarse cuando las semillas de la base viran a marrón procediéndose posteriormente a su secado al aire (Goplen *et al.* 1991). Thomson (1951) observó una mayor viabilidad de las semillas almacenadas con cascarilla frente a las semillas desnudas.

De media, la producción de semillas es de 500 a 900 kg/ha, pudiendo alcanzar su rendimiento los 1100kg/ha (Thomson 1951) siendo más bajo en las variedades de tipo común que en las de tipo gigante (Prosperi *et al.* 1994).

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agustín M (1617). Libro de los secretos de la agricultura, casa de campo y pastoril. Ed: Imprenta J. Piferrer, Barcelona, España. 512 pp.
- Akin D (1982). Forage cell wall degradation and p-coumaric, ferulic, and sinapic acids. *Agronomy Journal* 74: 424-428.
- Aldrich DTA (1984). Lucerne, red clover and sainfoin- herbage production. Thomson DJ. En: Forage legumes, Occasional Symposium 16, BGS, Hurley. 126-131.
- Antón Ramírez B (1865). Diccionario de Bibliografía agronómica. Ed: M. Rivadeneyra, Madrid, España. 1015 pp.
- Arán S (1929). Cultivos forrajeros y alimentación del ganado. Ed: Huelves y Cia, Madrid, España. 398 pp.
- Asso I (1798). Historia de la economía política de Aragón. Ed: Librería General, Zaragoza, España. 487 pp.
- Ayres J, Kelman W, Wiedemann S, Lane L, McCorkell B (2008). Developing birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) varieties for permanent pasture applications in low latitude regions of eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 488-498.
- Badoux S (1965). Étude des caractères morphologiques, physiologiques et agronomiques de populations d'esparcette (*Onobrychis spp.*). *Recherche Agronomique Suisse* 4: 111-190.
- Bagavathiannan M, Julier B, Barre P (2010). Genetic diversity of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits. *Euphytica* 173: 419-432.
- Bal M, Ozturk D, Aydin R, Eral A, Ozkan C, Ata M, Karakas E, Karabay P (2006). Nutritive value of sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) harvested at different maturity stages. *Pakistan Journal of Biological Science* 9: 205–209.
- Barea J, Azconaguilar C, Azcon R (1987). Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N<sub>2</sub> fixation and N uptake from soil as assessed with a N<sub>15</sub> technique under field conditions. *New Phytologist* 106: 717-725.
- Bate-Smith E (1973). Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* 12: 1809 -1812.
- Beever D, Dhanoa M, Losada H, Evans R, Cammell S, France. J (1986). The Effect of forage species and stage of harvest on the processes of digestion occurring in the rumen of cattle. *British Journal of Nutrition*. 56: 439-454.
- Ben Chaabane A, Delgado I (1994). Characterisation of rhizomatous-rooted lucernes. REUR, Technical series 36: 70-72.
- Benaiges C (1915). Las forrajeras de secano en el Alto Aragón: La esparceta o pipirigallo. Hojas Divulgadoras nº 20-21. Ed: Ministerio de Fomento, Madrid, España, 16 pp.
- Benaiges C (1971). La esparceta. Hojas divulgadoras 6-55H. Ed: Ministerio de Agricultura, Madrid, España, 16 pp.
- Blanco D (1857). Elementos de agricultura. El Consultor de Ayuntamientos, Madrid, España. 357-361 pp.
- Bland B (1971). Crop Production: Cereals and Legumes. Ed: Academic Press, London, UK. 466 pp.



- Borreani G, Peiretti P, Tabacco E (2003). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in the spring growth cycle. *Agronomie* 23: 193-201.
- Brink R, Cooper D (1938). Partial self-incompatibility in *Medicago sativa*. *Proceedings National Academy of Science* 24: 497-499.
- Buendía Lázaro F, García Salmerón S (1965). Estudio botánico, ecológico y pascícola de las principales especies espontáneas de los pastizales de montaña de nuestras regiones semiáridas. Monografía del género *Onobrychis*. Ed: Ministerio de Agricultura, Madrid. 51 pp.
- Burton J, Curley R (1968). Nodulation and nitrogen fixation in sainfoin (*Onobrychis sativa* LAM.) as influenced by strains of rhizobia. En: Sainfoin Symposium, Montana State University, USA.
- Buxton D (1996). Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science and Technology* 59: 37-49.
- Caballero G (1972). Ecology, agronomic and nutritive value of species and varieties of forage interest for Spain. *Pastos*. 183-198 pp.
- Carlton A, Cooper C, Delaney R, Dubbs A, Eslick R (1968). Growth and forage quality comparisons of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agronomy Journal* 60: 630-632.
- Cash S, Ditterline R (1996). Seed size effects on growth and N-2 fixation of juvenile sainfoin. *Field Crops Research* 46: 145-151.
- Charmet G, Balfourier F, Bion A (1990). Agronomic evaluation of a collection of French perennial ryegrass populations -multivariate classification using genotype- x environment interactions. *Agronomie* 10: 807-823.
- Chassagne J, Chambon J (1993). Le sainfoin: une légumineuse pour les sols de Causses. Application à la région agricole de Gramat et de Limogne. *Fourrages* 134: 177-181.
- Chen B (1992). Sainfoin. Ed: Gansun Sci-tech Press, Lanzhou, China
- Coello (1801). *Historia general de la agricultura*. Ed: Jaime Seix, Barcelona. 1062 pp.
- Commission European Community (2002). Communication from the Commission to the Council and the European Parliament: Mid-Term Review of the Common Agricultural Policy. Ed: CEC, Bruxelles, Belgique, 394 pp.
- Cooper C (1972). Growth analysis of two sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) growth types. *Agronomy Journal* 64: 611-615.
- Culvenor R, Boschma S, Reed K (2009). Response to selection for grazing tolerance in winter-active populations of phalaris (*Phalaris aquatica* L.). 2. Correlated response in yield potential, plant characteristics, and alkaloid levels. *Crop and Pasture Science* 60: 1107-1116.
- Cunningham SM, Gana JA, Volenec JJ, Teuber LR (2001). Winter hardiness, root physiology, and gene expression in successive fall dormancy selections from 'Mesilla' and 'CUF 101' alfalfa. *Crop Science* 41: 1091-1098.
- Davies D, Hopkins A (1996). Production Benefits of Legumes in Grassland. Society BG. En: Legumes in Sustainable Farming System. Occasional Symposium No. 30D Younie. 234-246.
- De Falco E, Landi G, Basso F (2000). Production and quality of the sainfoin forage (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as affected by cutting regime in a hilly area of southern Italy. *Cahiers Options Méditerranéennes* 45: 275-279.
- De Giorgio D, Maiorana M, Fornaro F (2000). Root growth analysis in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) submitted to different harvest times. *Cahiers Options Méditerranéennes* 45: 157-160.
- De Haan H (1955). Origin of westerwolths ryegrass. *Euphytica* 4: 206-210.

- De Travane M (1848). Catecismo de agricultura universal. Ed: Saunague, Madrid, España. 374 pp.
- De las Heras M, Hidalgo P, Ubera J (2001). Stigmatic cuticle in *Hedysarum glomeratum*: structure and function. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 41-42.
- Delgado I, Andres C, Sin E, Ochoa M (2002). Estado actual del cultivo de la esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Encuesta realizada a agricultores productores de semilla. En: *Pastos*. 235-247.
- Delgado I (2007). Cubierta vegetal para tierras de cultivo en abandono. En: *Manuales de Desarrollo Sostenible. 4. Restauración y mejora de zonas esteparias*. Ed. Fundación Santander Central Hispano, Madrid, España. 30-34 pp.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoum S, Buil I, Congost S (2008a). La esparceta o pipirigallo. Ed: Diputación General de Aragón, Zaragoza, España, 8 pp.
- Delgado I, Salvia J, Buil I, Andrés C (2008b). The agronomic variability of a collection of sainfoin accessions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 401-407.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoum S (2010a). Caracterización y valor nutritivo de diferentes estados fenológicos de la esparceta. En: *IV Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes, Zamora - Miranda do Douro*. 247-252.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoum S (2010b). Evolution of the feeding value of sainfoin as affected by the phenological development. En: *13th meeting for Mediterranean Forage Resources (FAO), Alicante, Spain*.
- Diaz S, Lavorel S, McIntyre S (2007). Plant trait responses to grazing - a global synthesis. *Global Change Biology* 13: 313-341.
- Doyle CJ, Thomson DJ, Sheehy JE (1984). The future of sainfoin in British Agriculture: an economic assessment. *Grass and Forage Science* 39: 43-51.
- Doyle E (1799). *Tratado sobre la cría y propagación de pastos y ganados*. Ed: Imprenta Real, Madrid, España. 110-111 pp.
- Drobna L (2010). Morphological variation in natural populations of *Lotus corniculatus* in association to geographical parameters of collecting sites. *Biologia* 65: 213-218.
- Eken C (2003). First report of *Ascochyta fabae* on sainfoin in Turkey. *Plant Pathology* 52: 421-421.
- Eken C, Demirci E (2003). Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia anastomosis* groups isolated from forage legumes in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica* 31: 76-80.
- Eken C, Demirci E, Dane E (2004). Species of *Fusarium* on sainfoin in Erzurum, Turkey. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 47: 261-263.
- Espinosa J (1822). *Cartilla agraria, o sea la práctica de la agricultura y de la ganadería*. Ed: Imprenta de León Amarita, Madrid, España. 174-175 pp.
- Eujayl I, Sledge MK, Wang L, Chekhoskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR (2004). *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 414-422.
- Falahati-Anbaran M, Habashi AA, Esfahany M, Mohammadi SA, Ghareyazie B (2004). Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. *Journal of Genetics* 86: 59-63.
- Flaresso J, Desaibro J (1992). Influence of cutting regimes and fertilization on the dry-matter yield, total nonstructural carbohydrates reserves, and natural reseeding of *Lotus corniculatus* L. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 27: 181-188.
- Frame J, Charlton JFL, Laidlaw AS (1998). *Temperate forage legumes*. Ed: CAB International, Wallingford. 327 pp.

- Gabarrou R (1993). Revolución o revoluciones agrarias del siglo XIX: su difusión en el mundo mediterráneo. En: Actas de las Jornadas de Historia agraria "Agriculturas mediterráneas y mundo campesino: cambios históricos y retos actuales", Almería. 95-109.
- Gaitán-Solís E, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus ssp.* Crop Science 42: 2128-2136.
- Galloni M, Podda L, Vivarelli D, Cristofolini G (2007). Pollen presentation, pollen-ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterranean legumes (fam. Fabaceae – subfam. Faboideae). Plant Systematics and Evolution 266.
- García Salmerón J, Montserrat P, Buendía F, Ruiz-del-Castillo A, Allue J (1966). Studies of botany, ecology, biology and pascology of the principal existing species in the spontaneous pasture-grounds of mountains of our semiarid regions. Ed: Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, Madrid, España, 154 pp.
- Gasparín A (1846). Cours d'agriculture. Ed: Librairie Agricole de la Maison Rustique IV, Paris, France. 780 pp.
- Goplen B, Richards K, Moyer J (1991). Sainfoin for western Canada. Ed: Agriculture Canada, Ottawa
- Gosh S, Shivanna K (1982). Anatomical and cytochemical studies on the stigma and style in some legumes. Bot. Gaz. 143: 311-318.
- Gray F, Shigaki T, Koch D, Delaney R, Gray A, Majerus M, Cash D, Ditterline R, Wichman D (2006). Registration of 'Shoshone' Sainfoin. Crop Science 46: 988.
- Hagerman A (2002). The tannin handbook. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/> (último acceso el 12/11/2011).
- Hayot-Carbonero C, Mueller-Harvey I, Brown TA, Smith L (2010). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. Plant Genetic Resources 9: 70-85.
- Herrero M (2001). Ovary signals for directional pollen tube growth. Sexual Plant Reproduction 14: 3-7.
- Heslop-Harrison J (1975). Incompatibility and the pollen-stigma interaction. Annu. Rev. Plant Physiol. 26: 403-425.
- Heuze G (1887). Les pâturages, les prairies naturelles et les herbages. Ed: Librairie Agricole Maison rustique, Paris. 356 pp.
- Hill R (1998). Sainfoin: The not quite forgotten legume. En: Alternative Forages for Ruminants. Ed: Lane GPF, Wilkinson JM. Chalcombe Publications, Welton, UK. 55-59 pp.
- Hiscock S, Allen A (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. New Phytologist 179: 286-317.
- Hormaza J, Herrero. M (1996). Dynamics of pollen tube growth after different competition regimes. Sex. PlantReproduction 9: 153-160.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg S, Hoskin SO (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends in Parasitology 22: 253-261.
- Hughes S (1949). Studies on some diseases of sainfoin (*Onobrychis sativa*) II. The life history of *Ramularia onobrychidis* Allescher. Transactions of the British Mycological Society 32: 34-59.
- Hutchinson J (1965). Crop plant evolution: a general discussion. En: Essays on Crop Plant Evolution. Ed. University Press, Cambridge, UK. 166-181 pp.
- Huyghe C (1998). Genetics and genetic modifications of plant architecture in grain legumes: a review. Agronomie 18: 383-411.

- Iannucci A, Terribile M, Martiniello P (2008). Effects of temperature and photoperiod on flowering time of forage legumes in a Mediterranean environment. *Field Crops Research* 106.
- Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C (1995). Les herbivores ruminants. En: *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion*. Ed: Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce M, Journet M. INRA Editions, Paris, France. 1-24 pp.
- Jean-Blain C (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 911-920.
- Jensen E, Sharp M (1968). Agronomic evaluation of sainfoin in Nevada. En: *Sainfoin Symposium*, Montana State University. 34-37.
- Jones W, Mangan J (1977). Complex of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) with fraction 1 leaf protein and with submucillary, microprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of Science and Food Agriculture* 28: 126-136.
- Kallenbach R, Matches A, Mahan J (1995). Daylength influence on the growth and metabolism of sainfoin. *Crop Science* 35: 831-835.
- Kallenbach R, Matches A, Mahan J (1996). Sainfoin regrowth declines as metabolic rate increases with temperature. *Crop Science* 36: 91-97.
- Karnezos T, Matches A, Brown C (1994). Spring lamb production on alfalfa, sainfoin, and wheatgrass pastures. *Agronomy Journal* 86: 497-502.
- Kidambi S, Mahan J, Matches A (1990). Purification and thermal dependence of glutathione reductase from two forage legume species. *Plant Physiology* 92: 363-367.
- Kim T, Ourry A, Boucaud J, Lemaire G (1991). Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (*Medicago sativa* L.) following removal of shoots. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 593-602.
- Koch D, Dotzenko A, Hinze G (1972). Influence of three cutting systems on the yield, water use efficiency, and forage quality of sainfoin. *Agronomy Journal* 64: 463-467.
- Koter Z (1965). Nutrition of leguminous plants. 1. The effect of different forms of N on the growth and symbiotic N<sub>2</sub>-fixation by red clover and sainfoin plants. 2. The effect of increasing amount of N on the yield and N<sub>2</sub>-fixation by Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* var. *persica*). *Pamiętnik pulawski* 20: 3-37.
- Koupai-Abyazani M, Muir A, Bohm B, Towers G, Gruber M (1993). The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34: 113-117.
- Landsberg J, Lavorel S, Stol J (1999). Grazing response groups among understorey plants in arid rangelands. *Journal of Vegetation Science* 10: 683-696.
- Lara MTd (1877). *Lecciones elementales de agricultura*. Ed: Sociedad Tipográfica, Madrid, España. 448 pp.
- Lees G, Grube M, Suttill N (1995). Condensed tannins in sainfoin. II. Occurrence and changes during leaf development. *Canadian Journal of Botany* 73: 1540-1547.
- Li R, Volenc JJ, Joern BC, Cunningham SM (1996). Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. *Crop Science* 36: 617-623.
- Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K (2004). Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 361-369.
- Linskens HF, Konar RN (1965). Some observations on the stigmatic exudate in *Petunia hybrida*. Springer Berlin / Heidelberg. *En Naturwissenschaften* 625.
- Liu Z, Lane G (2005). The effect of sowing date and autumn management on Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) regrowth and yield. En: *Proceedings of XX International Grassland Congress*.

- Liu Z, Lane G, Davies W (2008). Establishment and production of common sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in the UK. 1. Effect of sowing date and autumn management on establishment and yield. *Grass Forage Science* 63: 234-241.
- Magne J (1845). Principes d'agriculture et d'hygiène vétérinaire. Ed: Librairie Chez Labé, Paris. 208-232 pp.
- Maiorana M, Giorgio DD, Rizzo. V (1995). Harvest time and cutting height in pure perennal meadows. *Cahiers Options Méditerranéennes* 12: 63-66.
- Makkar H (2000). Quantification of tannins in tree and shrub foliage. En: A Laboratory Manual. Ed: Energy FaAOotUNIA, Vienna. 26 pp.
- Martiniello P, Ciola A (1994). The effect of agronomic factors on seed and forage production in perennial legumes sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and French honeysuckle (*Hedysarum coronarium* L.). *Grass and Forage Science* 49: 121-129.
- Martiniello P, Llaudadio V, Pinto V, Ciruzzi B (2000). Influence des techniques de culture sur la production de sulla et de sainfoin en milieu méditerranéen. *Fourrages* 161: 53-59.
- Mathre D (1968). Disease in sainfoin. En: Sainfoin Symposium, Montana State University. 65-66.
- Mc Mahon L, Majak L, McAllister T, Hall J, Jones G, Popp J, Cheng K (1999). Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 203-212.
- Mc Nabb W, Waghorn G, Barry T, Shelton I (1993). The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. *British Journal of Nutrition* 70: 647-661.
- Meyer D (1975). Yield, regrowth and persistence of sainfoin under fertilisation. *Agronomy Journal* 67: 439-441.
- Michelana A, Hycka M (1988). Diferenciación y caracterización de dos tipos de esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) cultivada en España. *Investigación Agraria: Producción y Protección vegetales* 3: 285-290.
- Michelana A (1983). Tesis: Estudio de la variabilidad de la esparceta cultivada (*Onobrychis viciifolia* Scop.) en España, Lérida. 198 pp.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, Mc Nabb WC (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106: 3-19.
- Ministerio de Agricultura (1946-2010). Anuarios Estadísticos de la Producción Agraria. Ed: M.A.P.A, Madrid
- Moliner M (1982). Diccionario de uso del español. Ed: Gredos, Madrid. 1585 pp.
- Monserrat P, Oliver S (1975). Pastos y forrajes del Ebro, mesetas y zona oriental. Ed: Instituto Pirenaico de Ecología, Jaca, 34 p pp.
- Montserrat P, Capdevilla M (1964). La esparceta en el nordeste español. En: V Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, Jaca-Pamplona. 10 pp.
- Moore K, Barry T, Cameron P, Lopez-Villalobos N, Cameron D (2003). Willow (*Salix* sp.) as a supplement for grazing cattle under drought conditions. *Animal Feed Science and Technology* 104: 1-11.
- Morrill W, Ditterline R, Cash S (1998). Insect pests and associated root pathogens of sainfoin in western USA. *Field Crops Research* 59: 129-134.
- Mowrey D, Matches A (1991). Persistence of sainfoin under different grazing regimes. *Agronomy Journal* 83: 714-716.
- Mowrey D, Volesky J (1993). Feasibility of grazing sainfoin on the southern great plains. *Journal of Range Management* 46: 539-542.

- Moyer J (1985). Effect of weed control and a companion crop on alfalfa and sainfoin establishment, yields and nutrient composition. *Canadian Journal of Plant Science* 65: 107-116.
- Mueller-Harvey I, McAllan. A (1992). Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology. En: Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. Ed: Morrison I. JAI Press Ltd., London, UK. 151-217 pp.
- Muller J (1893). Diccionario universal de agricultura. Ed: A. Elías y Cia., Barcelona. 786 pp.
- Negri V, Veronesi F, Falcinelli M (1987). Germplasm evaluation of *Onobrychis viciifolia* Scop. for agronomic traits. *Genetica Agraria* 41: 25-40.
- Newman G (1997). An overview of forage legumes. En: Alternative Forages for Ruminants. Ed: Lane G, Wilkinson J. Chalcombe Publication, Cirencester, UK. 3-14 pp.
- Nguyen TM, Binh DV, Orskov E (2005). Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. *Animal Feed Science and Technology* 121: 77-87.
- Pardo A, Falco ED, Franchi ED (2000). Dynamics of shoot and root growth and adaptation to the environment of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in a hilly area of southern Italy. *Cahiers Options Méditerranéennes* 45: 271-274.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) Simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1275-1287.
- Pecetti L, Romani M, Rosa LD, Piano E (2008). Selection of grazing-tolerant lucerne cultivars. *Grass and Forage Science* 63: 360-368.
- Prevost D, Bordeleau L, Antoun H (1987). Symbiotic effectiveness of indigenous arctic rhizobia on temperate forage legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Plant and Soil* 104: 63-69.
- Prosperi J, Demarquet F, Angevain M, Mansat P (1994). Evaluation agronomique de variétés de pays de sainfoin (*Onobrychis sativa* L.) originaires du sud-est de la France. *Agronomie* 14: 285-298.
- Provorov N, Tikhonovich I (2003). Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 89-99.
- Puchala R, Min B, Goetsch A, Sahlu T (2005). The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science* 83: 182-186.
- Ramirez Restrepo CA, Barry TN (2005). Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 120: 179-201.
- Requejo F, Tortosa M (1912). Elementos de agricultura y técnica agrícola e industrial. Ed: Jaime Ratés, Madrid. 301-302 pp.
- Rochon JJ, Doyle CJ, Greef JM, Hopkins A, Molle G, Sitzia M, Scholefield D, Smith CJ (2004). Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass and Forage Science* 59: 197-214.
- Rodrigo J, Herrero M (2002). The onset of fruiting in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Appl. Bot.* 76: 13-19.
- Rodríguez-Riaño T, Ortega-Olivencia A, Devesa J (1999). Biología floral en Fabaceae. Ed: Real Jardín Botánico, Madrid. 176 pp.
- Rumball W, Claydon. R (2005). Germplasm release - 'G35' Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *New Zealand Journal of Agricultural Research* 48: 127-128.
- Scott KD, Egger P, Seaton G, Rosetto M, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 723-726.
- Seker H, Rowe D, Brink G (2003). White clover morphology changes with stress treatments. *Crop Science* 43: 2218-2225.

- Shan M, Singh K, Kachroo D, Khanday B (1991). Performance of lucerne and sainfoin under different cuttings and levels of phosphorus. *Indian Journal of Agronomy and Crop Science* 36: 61-66.
- Shaw A (1968). The certification program for sainfoin in Montana. En: *Sainfoin Symposium*, Montana State University. 77-78.
- Sheaffer C, Lacefield G, Marble V (1988). Cutting schedules and stands. En: *Alfalfa and alfalfa improvement*. Ed: Hanson A, Barnes D, Hill R, Madison. 411-437 pp.
- Sheehy J, Popple S (1981). Photothesis, Water Relations, Temperature and Canopy Structure as Factors Influencing the Growth of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and Lucerne (*Medicago sativa* L.). *Annals of Botany* 48: 113-128.
- Sheehy J, Minchin F, McNeill A (1984). Physiological principles governing the growth and development of lucerne, sainfoin and red clover. *Forage Legumes*: 112-125.
- Sheldrick R, Thomson D (1982). Management and utilization of sainfoin. Information leaflet No 13. Ed: The Animal and Grassland Research Institute., 1-4 pp.
- Sheldrick R, Newman G, Roberts D (1995). Legumes for milk and meat. Ed: Chalcombe Publications, Canterbury. 57-62 pp.
- Shivanna K, Owens S (1989). Pollen-pistil interactions (Papilionoideae). En: *Advances in legume biology*. Ed: Zarucchi J. Missouri Botanical Garden. 157-182 pp.
- Simon J, Jacquet A, Decau M, Goulas E, Dily FL (2004). Influence of cutting frequency on the morphology and the C and N reserve status of two cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.). *European Journal of Agronomy* 20: 341-350.
- Sims J, Muir M, Carleton A (1968). Evidence of ineffective rhizobia and its relation to the nitrogen nutrition of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*). En: *Sainfoin Symposium*. Montana Agriculture Experimental Station Bulletin. 8-12.
- Skadhauge B, Gruber M, Thomsen K, Wettstein DV (1997). Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissues. *American Journal of Botany* 84.
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B (1997). Use of short microsatellites to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 264-272.
- Spedding C, Diekmahns E (1972). *Grasses and Legumes in British Agriculture*. Ed: CAB International, Wallingford, 404-413 pp.
- Sprent J, Mannetje L (1996). The role of legumes in sustainable farming system: past, present and future. Society BG. En: *Legumes in Sustainable Farming Systems*. Occasional Symposium No. 30 Younie, D. 2-14.
- Stebler F (1894). *Les meilleures plantes fourragères*. Ed: KJ Wyss, Berna. 138 pp.
- Subira Nicolau J (1888). *Compendio de agricultura*. Ed: Seminario Conciliar, Santiago. 397 pp.
- Szalai Z (2001). Development of meliferous plant mixtures with long lasting flowering period. En: *Proceedings of the eight international pollination symposium: integrator of crops and native plant systems*. Acta Horticulturae. 185-190.
- Teixeira EI, Moot DJ, Mickelbart MV (2007). Seasonal patterns of root C and N reserves of lucerne crops (*Medicago sativa* L.) grown in a temperate climate were affected by defoliation regime. *European Journal of Agronomy* 26: 10-20.
- Terrill T, Douglas G, Foote A, Purchas R, Wilson G, BARRY T (1992a). Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *Journal of Agriculture Science* 199: 265-273.

- Terrill T, Rowan A, Douglas G, Barry T (1992b). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58: 321-329.
- Theander O, Aman P (1984). Anatomical and chemical characteristics. En: Straw and others fibrous by-products as feed. Ed: Sundstol F, Owen E. Elsevier, Amsterdam. 45-78 pp.
- Theodorou M, Barahona R, Kingston-Smith A, Sanchez S, Lascano C, Owen E, Morris C (1999). News perspectives on the degradation of plant biomass in the rumen in the absence and presence of condensed tannins. En: Tannins in livestock and human nutrition. Ed: Brooker J. ACIAR Proceedings, Canberra.
- Thomson D (1951). Sainfoin in the first harvest year. *Journal of the British Grassland Society* 6: 107-117.
- Thomson D (1976). Legumes for Today and Tomorrow. *Science in Grassland*: 25-32.
- Thomson JR (1938). Cross and self-fertility in sainfoin. *Ann Appl Biol* 25: 695-704.
- Tufenkci S, Erman M, Sonmez F (2006). Effects of phosphorus and nitrogen applications and *Rhizobium* inoculation on the yield and nutrient uptake of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* L.) under irrigated conditions in Turkey. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 49: 101-105.
- Valcarcel J (1798). *Agricultura general y gobierno de la casa de campo*. Ed, Madrid. 448 pp.
- Valdés E (2000). *Onobrychis*. En: *Flora Iberica*. Ed: Castroviejo. CSIC, Madrid. 955-960 pp.
- Van Soest PJ, Wine RW (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. The determination of plant cell wall constituents. *A.O.A.C Journal*. 50-55 pp.
- Waghorn G, Jones W, Shelton I, Mc Nabb W (1990). Condensed tannins and the nutritive value of herbage. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 51: 171-176.
- Waghorn G, Mc Nabb W (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 383-392.
- Wallace L (1968). Current and potential insect problems of sainfoin in America. En: *Sainfoin Symposium*, Montana State University. 67-70.
- White G, Powell W (1997). Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology* 6: 1195-1197.
- Wiersma D, Smith R, Mlynarek J, Rand R, Sharpee D, Undersander D (1998). Harvest management effects on red clover forage yield, quality, and persistence. *Journal of Production Agriculture* 11: 309-313.
- Wiesner L, Carleton A, Cooper C (1968). Factors affecting sainfoin seed germination and emergence. En: *Sainfoin Symposium*, Montana Agriculture Experimental Station Bulletin. 13-15.
- Wong C, Stur W (1996). Persistence of tropical forage grasses in shade environments. *Journal of Agricultural Science* 126: 151-159.
- Wünsch A, Hormaza JI (2002). Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L) genotypes using peach (*Prunus persica* (L) Batsch) SSR sequences. *Heredity* 89: 56-63.
- Zhang Y, Sledge MK, Bouton JH (2007). Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 1367-1378.
- Zolla D (1904). *Dictionnaire d'Agriculture*. Ed: Paris. 678 pp.



### III. OBJETIVOS DE LA TESIS

La presente tesis tiene por finalidad estudiar la potencialidad productiva de la esparceta, a través de la evaluación agromorfológica y la composición química de una muestra representativa de las diferentes variedades que se cultivan en Europa, y de su evolución y persistencia en función de diferentes ritmos de corte. Adicionalmente, se caracterizan genéticamente las variedades de la colección y, por otra parte, se estudia su biología floral con el fin de identificar las fases y los factores limitantes del proceso reproductor en la esparceta.

El estudio se llevará a cabo a través de cuatro ensayos:

**Ensayo I: “Caracterización agronómica y composición química de una colección de esparcetas”.** En él se pretende caracterizar agronómicamente y determinar la composición química de una colección de esparcetas, representando las esparcetas locales cultivadas en España, junto con material comercial representativo de distintos lugares de Europa y dos líneas seleccionadas, con el fin de conocer la variabilidad existente entre variedades y las similitudes o diferencias que pueden presentar.

**Ensayo II: “Amplificación inter-genérica de EST-SSRs y similitud genética en el género *Onobrychis*”.** Este ensayo complementa al Ensayo I y pretende la caracterización de dicha colección de esparcetas y la evaluación preliminar de su diversidad genética mediante el uso de microsatélites EST-SSR. En ausencia de *loci* de microsatélites disponibles en el género *Onobrychis*, se ha evaluado la transferibilidad de marcadores de microsatélites de *Medicago* y *Glycine* a especies de *Onobrychis*.

**Ensayo III: “Efecto del ritmo de corte sobre el rendimiento, la composición química del forraje y la dinámica de reservas radiculares en dos variedades de esparceta”.** En este experimento se estudia el efecto de ritmos de corte contrastados sobre el rendimiento y la composición química del forraje, así como su influencia sobre el estado de las reservas radiculares, en dos variedades representativas de los dos tipos de esparceta, uno y dos cortes, con el fin de definir el manejo óptimo para cada tipo. Los parámetros estudiados se complementan con una descripción morfológica de la planta en el momento de su evaluación.

**Ensayo IV: “Ensayo IV: Biología reproductiva de la esparceta”.** En él se acomete el estudio de la biología reproductiva de la esparceta, abordando la descripción morfológica de la flor, la descripción y cinética de su desarrollo, la caracterización de la fase progámica y el estudio del nivel de autocompatibilidad de la esparceta.



## **Ensayo I: Caracterización agronómica y composición química de una colección de esparcetas**

### **I. OBJETIVOS**

Este experimento pretende caracterizar agronómicamente y morfológicamente, así como determinar la composición química de una colección de esparcetas, representando las esparcetas locales cultivadas en España, junto con material comercial representativo de distintos lugares de Europa y dos líneas seleccionadas, con el fin de conocer la variabilidad existente entre variedades y las similitudes o diferencias que pueden presentar.

Ello se ha llevado a cabo mediante:

1. La cuantificación de la intensidad de floración.
2. La estimación del porte.
3. El estudio de la evolución anual de la producción de materia seca del forraje.
4. La evaluación de los parámetros de composición química del forraje (proteína bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, lignina ácido detergente y taninos condensados) en los diferentes cortes practicados.
5. La incidencia de plagas y enfermedades.
6. La mortalidad de las plantas

### **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

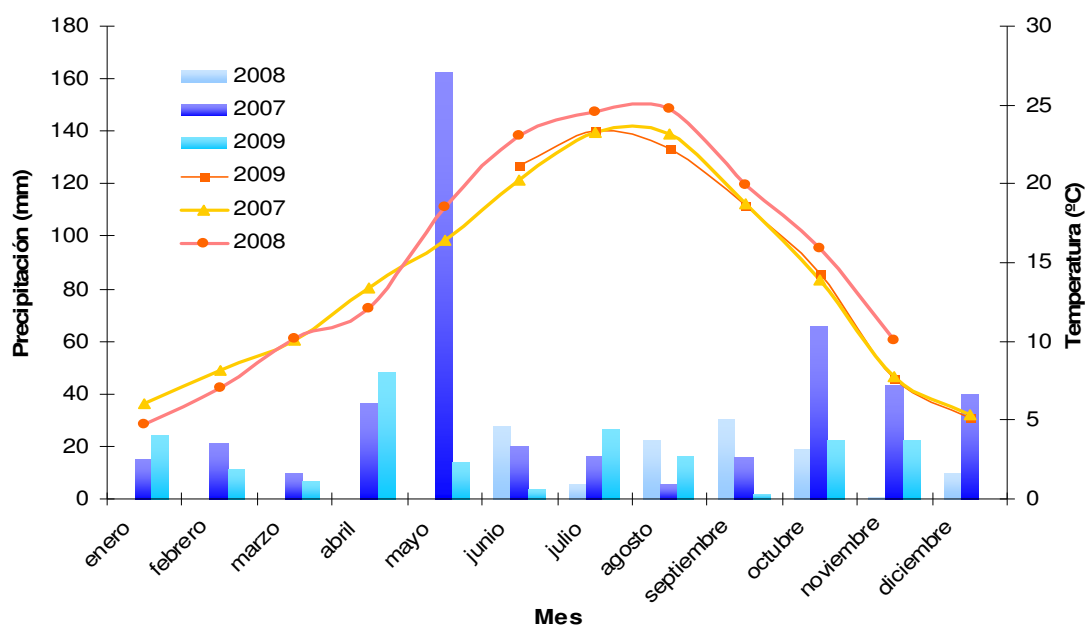
#### **II.1 Localización del experimento y condiciones físicas de la parcela**

El ensayo se llevó a cabo en la finca del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), localizada en Montañana (Zaragoza, 41°3'N; 0°47'W; altitud 225 m), durante el periodo 2007-2009.

La finca se ubica en un suelo aluvial, nivelado para riego por inundación. Las características edafológicas de la parcela, entre 0 y 30 cm de profundidad, corresponden a un suelo de textura franco-limosa, no salino (0,41CE; 1,5dδ/m) y de fertilidad media, sin problemas de relevancia para el cultivo de la esparceta. En la **Tabla II.1.a** se presentan los resultados de los análisis granulométricos y de fertilidad del suelo. El clima de la zona es de tipo mediterráneo subhúmedo; las temperaturas máxima, mínima y media mensuales, así como las precipitaciones acumuladas mensualmente durante el ciclo de cultivo, se muestran en la **Figura II.1**. Los datos climáticos se obtuvieron de la estación meteorológica ubicada en la propia finca. Las precipitaciones medias anuales oscilaron entre 240,9 mm y 450,6 mm; la temperatura media del mes más frío fue de 5,2 °C y la del mes más caluroso 23,8 °C.

**Tabla II.1.a** Análisis granulométrico y de fertilidad del suelo de la parcela del ensayo en 2007.

Determinaciones	Método	Unidad	Valor	(+/-)
Textura (criterio U.S.D.A.)				
Arena total (0,05-2 mm)	Sedimentación	% p/p	26,15	
Limo grueso (0,02-0,05 mm)	Sedimentación	% p/p	29,38	
Limo fino (0,002-0,02 mm)	Sedimentación	% p/p	26,49	
Arcilla (<0,002mm)	Sedimentación	% p/p	17,98	
Fertilidad				
pH al agua 1:2,5	Potenciometría		8,24	0,1
Prueba previa de salinidad (C.E. 1:5)	Oficial	dS/m	0,24	0,001
Materia orgánica por espectroscopia	Oficial	% p/p	1,99	0,04
Fósforo Olsen por espectroscopía UV/V	Oficial	mg/kg	7,03	0,93
Potasio (extracto acetato amónico)	Abs. Atómica	mg/kg	134	
Cationes de cambio				
Magnesio	Abs. Atómica	meq/100g	1,22	



**Figura II.1** Valores de la temperatura media y evolución de la precipitación mensual durante el periodo 2007-2009 en el observatorio meteorológico del CITA en Montañana (Zaragoza).

## II.2. Material vegetal

Se evaluaron 23 cultivares y poblaciones locales de esparceta; la relación de las mismas, así como su origen, se presenta en la **Tabla II.2**. De ellas, 12 fueron variedades comerciales europeas, representando a los cultivares disponibles en el mercado y nueve, poblaciones locales españolas elegidas por su representatividad dentro del grupo de 38 poblaciones recolectadas en el nordeste de España, en una prospección llevada a cabo durante 2001-2002 (Delgado *et al.* 2002). El estudio se incrementó con dos selecciones obtenidas en el CITA, la ‘Selección 7.2’ por un criterio de persistencia y la ‘Selección 9.1’ por su escasa intensidad de floración en el año de siembra.

Para facilitar la redacción, en lo sucesivo a los cultivares, poblaciones locales y selecciones se les aplicará el nombre genérico de “variedad”.

### II.3. Diseño experimental

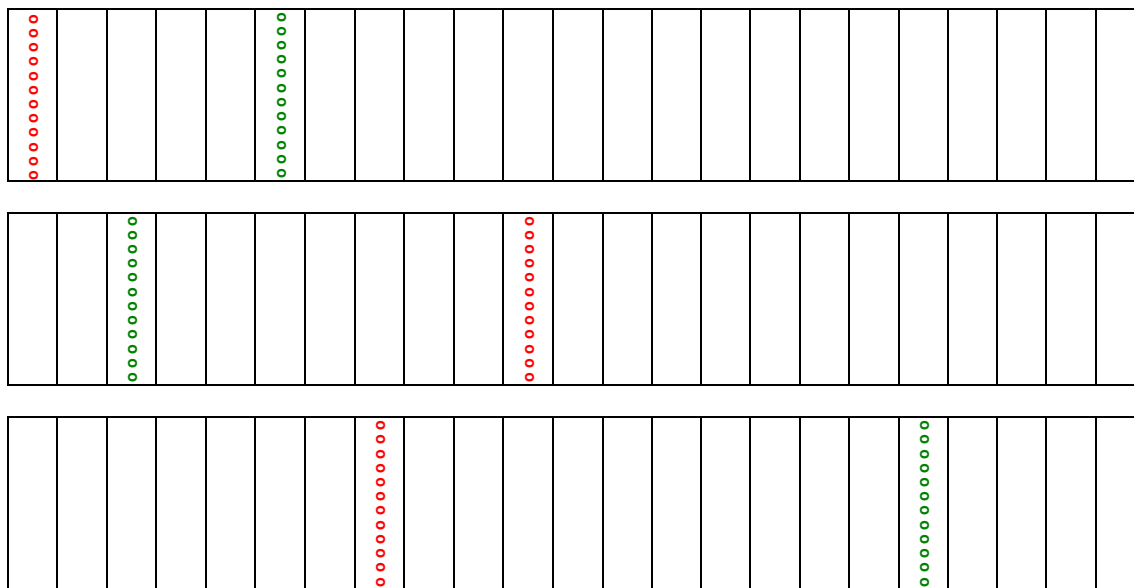
El ensayo se ubicó en una parcela preparada para riego a manta o por inundación, que es la práctica habitual en la finca. Las labores de preparación del suelo, previas al establecimiento del ensayo, consistieron en un pase de chisel seguido de dos pases de grada. Como abonado de fondo se aportaron 400 kg/ha del complejo 8-24-8. No se aplicaron herbicidas de presiembr.

La siembra se llevó a cabo en bandejas de poliespán con alveolos individuales 5x5x10 cm de tamaño, a razón de una semilla por alveolo, rellenos con una mezcla de arena, turba y tierra de cultivo a partes iguales, los cuales se instalaron en un invernadero el 18 de abril de 2007. Cuando las plántulas disponían de al menos tres hojas multifoliadas, se trasplantaron al campo (el 13 de junio de 2007).

La plantación se realizó en líneas distanciadas un metro, a razón de una línea por variedad y 12 plántulas por línea, separadas entre sí 40 cm, según un diseño estadístico de bloques al azar con tres repeticiones (**Figura II.3**).

**Tabla II.2** Nombre y procedencia de las diferentes variedades utilizadas en el ensayo.

Variedad	Origen	Proveedor
Cotswold Common	Reino Unido	Cotswold seeds (UK)
Somborne	Reino Unido	Cotswold seeds (UK)
Esparcette	Polonia	Cotswold seeds (UK)
Sepial	Francia	Caussade semences (Fr)
Ambra	Italia	Caussade semences (Fr)
Fakir	Francia	INRA (Fr)
Ucrania	Ucrania	Rocalba S.A.(Es)
Incoronata	Italia	INEA Bari (It)
Visnovsky	República Checa	Research Institute for Fodder Crops
Yubileyna	Bulgaria	Forage Research Institute, Pleven
Korunga	Turquía	Agricultural Faculty, Izmir
Polonia	Polonia	Rocalba S.A.(Es)
Selección 9.2	España	CITA
Reznos	Soria (España)	Cultivar local
Selección 7.1	España	CITA
Mezquita de Jarque	Teruel (España)	Cultivar local
Lagueruela	Teruel (España)	Cultivar local
Loarre	Huesca (España)	Cultivar local
Villahoz	Burgos (España)	Cultivar local
Torrecilla de Cameros	Logroño (España)	Cultivar local
Graus	Huesca (España)	Cultivar local
Tartareu	Lleida (España)	Cultivar local
Villahermosa del Río	Castellón (España)	Cultivar local



**Figura II.3** Esquema del ensayo en tres bloques aleatorios de doce plantas por línea.

### II.3.1 Manejo del ensayo

El ensayo se desarrolló durante tres años, el primer año se establecieron las plantas y los dos siguientes fueron de producción. Durante los dos años que constituyeron el periodo productivo, campañas 2008 y 2009, no se aportaron más abonos minerales ni se realizaron tratamientos fitosanitarios y las malas hierbas se eliminaron mecánicamente con arado superficial (**Figura II.3.1**). La frecuencia del riego varió en función de las condiciones climáticas, siendo en general de un riego mensual en el periodo de primavera-verano.

El primer año se efectuó un único corte el 15 de septiembre del 2007, considerado de homogenización, con el fin de estimar posteriormente la capacidad de rebrote otoñal. En los dos años siguientes, las plantas se cortaron cada vez que alcanzaban el estado fenológico 'plena floración', definido como el estado en el cual el 50% de los tallos totales presentan inflorescencias con el 50% de las flores abiertas. En dicho estado, prácticamente la totalidad de los tallos presentaron inflorescencias con alguna flor abierta. Los diferentes cortes practicados se denominaron y ordenaron como C1, C2, C3, etc. dentro del mismo año, o como C1 1, C1 2, etc. y C2 1, C2 2, etc. si se especifica el año de producción.



**Figura II.3.1** Vista general del ensayo de variedades en febrero y abril de 2008.

### **II.3.2 Parámetros evaluados**

Se evaluaron los siguientes parámetros: En 2007, la intensidad de la floración; en 2008 y 2009, el porte, la fecha del corte, la producción y composición química de la MS, la manifestación de plagas y enfermedades y la mortalidad.

#### **II.3.2.1 Intensidad de floración**

La intensidad de floración es un criterio determinante para discriminar las variedades de uno y de dos cortes. De hecho, las variedades denominadas estrictamente “de dos cortes” son capaces de florecer en el año de establecimiento si se siembran en primavera, mientras que las estrictamente de un corte no presentan flores hasta el año siguiente de su establecimiento. Si se siembran en otoño, ambas variedades florecen en primavera. En este ensayo, sembrado en primavera, la intensidad de floración fue definida como el porcentaje de plantas que presentaron flores en una fecha determinada. Este criterio fue evaluado el 15 de septiembre 2007, fecha en la cual se consideraba que habían florecido todas las plantas que tuvieran dicha capacidad.

#### **II.3.2.2 Porte**

Se consideró el porte de las plantas como el cociente entre la altura de la planta y su radio. La altura se midió como la altura media de los tres tallos más altos desde el suelo hasta el ápice. El radio se estimó como la media de dos medidas ortogonales de la anchura de la planta. Las mediciones de porte se efectuaron sobre las plantas en campo previamente a cada corte, es decir, en el estado de plena floración (salvo en el rebrote otoñal que no florecía). Una relación de 1,0, 1,2, 1,4 y 1,6 correspondieron respectivamente a plantas rastreras, semi-rastreras, semi-erectas y erectas.

#### **II.3.2.3 Plagas y enfermedades**

Para detectar la presencia de plagas y enfermedades en las plantas se hizo un seguimiento al menos una vez al mes y semanalmente en verano. En 2009, antes de concluir el estudio, se efectuó un seguimiento para detectar la presencia potencial de virosis.

El grado de incidencia del oídio se estimó con una escala de 0 a 5 en función de la superficie foliar invadida en septiembre 2007 (0, no invadida; 5, totalmente blanquecina).

#### **II.3.2.4 Fecha de corte**

La fecha de corte se determinó para cada variedad, como el momento en que el 50% de las plantas de la variedad se encontraban en el estado de plena floración, con la excepción del corte realizado durante el periodo otoñal (que no florece).

En el primer corte, el intervalo (en días) entre la primera variedad en alcanzar la plena floración y las siguientes define la precocidad de las variedades.

#### **II.3.2.5 Producción de materia seca por planta**

Las plantas se cortaron individualmente con tijeras eléctricas, a una altura aproximada de 5 cm del suelo, y se introdujeron en bolsas de plástico que se condujeron al laboratorio para su pesaje. Se pesaron en fresco. Una muestra representativa de cada variedad y repetición se desecó en estufa de ventilación forzada a 60 °C hasta peso constante para la determinación de MS. Las muestras, una vez desecadas, se molieron con un molino Fritsch pulverisette provisto de un tamiz de 0,7 mm de poro. A continuación, se acondicionaron y almacenaron hasta el momento de efectuar las determinaciones analíticas previstas.

De la relación entre el peso desecado y el peso fresco de la muestra, se obtuvo la proporción de MS de cada repetición y variedad. Esta proporción se aplicó al peso fresco de cada planta para la determinación de la producción de MS.

### **II.3.2.6 Mortalidad**

La mortalidad se definió como la proporción de plantas que murieron por cada repetición de cada variedad (*i.e.* sobre 12 plantas). Las pérdidas se contabilizaron en cada corte. La mortalidad en el corte C2 5 representa la mortalidad al cabo de tres años.

### **II.3.2.7 Determinaciones analíticas**

Los parámetros y las técnicas utilizadas para la caracterización nutritiva de las muestras fueron las siguientes:

#### **II.3.2.7.1 Cenizas (Cz)**

La determinación del contenido en cenizas se realizó mediante la calcinación de las muestras en mufla a 550 °C durante seis horas.

#### **II.3.2.7.2 Proteína bruta (PB)**

La determinación del nitrógeno se realizó por el método Dumas de pirólisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno de los gases de combustión. Para calcular su contenido en PB se multiplicó el contenido del nitrógeno Dumas por el factor 6,25 (Helrick 1990).

#### **II.3.2.7.3 Fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD)**

Estos conceptos, definidos por Goering y Van Soest (1970) se basan en la separación de los hidratos de carbono estructurales de la célula de acuerdo con la disponibilidad nutritiva de los mismos.

##### **II.3.2.7.3.a FND**

La FND se define como la fracción del alimento insoluble en una solución del detergente sulfato de lauril-sodio tamponada a  $\text{pH}=7,0\pm 0,1$ , tras ebullición suave durante 1 hora. El concepto FND se considera como sinónimo de pared celular excepto pectinas, que son solubilizadas casi por completo en dicha solución (Van Soest *et al.* 1991).

##### **II.3.2.7.3.b FAD**

La FAD es la proporción de alimento insoluble en caliente en una solución del detergente bromuro de trimetil cetil amonio en ácido sulfúrico 1N tras ebullición suave durante 1 hora. Representa la fracción de celulosa y lignina, aunque se ha comprobado que también contiene la fracción de cutinas.

La diferencia entre NDF y ADF, expresadas libres de cenizas, proporciona una estimación del contenido en hemicelulosa de la muestra.

##### **II.3.2.7.3.c LAD**

La LAD se determina mediante la digestión de la muestra en ácido sulfúrico 72% (Goering y Van Soest 1970). El resultado es una estimación del contenido en lignina de la muestra. La diferencia entre ADF y ADL es una estimación del contenido en celulosa de la muestra.



#### **II.3.2.7.4 Taninos condensados (TC)**

Los taninos son unos compuestos presentes en la esparceta, a los que se les atribuye parte de sus cualidades nutritivas y antihelmínticas. El contenido en TC se determinó mediante el test de HCL-butanol descrito por Porter (1989), que consiste en una hidrólisis ácida de los TC en monómeros colorados, lo que permite su determinación por espectrofotometría visible (490 nm, espectrofotómetro Helios  $\beta$ , Thermo electron corporative, Inglaterra 2000).

#### **II.3.2.7.5 Utilización de la técnica NIRS para la determinación de la composición química del forraje**

La técnica NIRS se basa en la existencia de relaciones entre las características físicas, químicas y sensoriales de un producto con la absorbancia a longitudes de onda específicas en la región del "infrarrojo cercano", definida ésta, como la zona del espectro electromagnético que se encuentra entre la radiación visible (400-700 nm) y la del infrarrojo (700-2500 nm). Se utilizó dicha técnica debido a la gran cantidad de muestras existentes y a las ventajas que presenta respecto a las técnicas analíticas tradicionales. Entre las mismas podemos citar las siguientes: rapidez, precisión, no destructiva, facilidad de uso y no contaminante (Williams y Sobering 1996).

##### **II.3.2.7.5.a Recogida de espectros**

La recogida de sus espectros se realizó sobre las muestras, una vez molidas. Dichos espectros fueron obtenidos en un monocromador de espectro continuo (NIRSystem 6500), en la región de 400 a 2500 nm. El monocromador se encontraba acoplado al módulo spinning de presentación de muestras. Los valores de log (1/R) fueron obtenidos a intervalos de 2 nm, por lo que cada espectro estaba constituido por un total de 700 valores de log (1/R) en el caso de la región NIR (1100 - 2500 nm).

La presentación de las muestras se realizó en cápsulas redondas de 5 cm de diámetro, provistas con cristal de cuarzo en la base inferior. Previamente a la introducción en la cápsula, la muestra se homogenizaba. Cada cápsula contenía aproximadamente 4 g de muestra.

##### **II.3.2.7.5.b Análisis espectral**

Una vez obtenidos los espectros de la totalidad de las muestras, se procedió a su análisis mediante los algoritmos CENTER y SELECT incluidos en el software ISI.

El algoritmo CENTER calcula el centro de la población y la distancia de Mahalanobis (H) de cada muestra al centro de la población. Este programa nos permite detectar muestras que no pertenecen a la población espectral. Tras la aplicación del algoritmo CENTER a las muestras obtenidas, se utilizó el algoritmo SELECT para la elección de las muestras representativas de la población total. Dicho algoritmo calcula la distancia entre dos espectros. Se consideró que dos espectros eran similares si estaban situados a una distancia  $H < 0,6$  como proponen Shenk y Westerhaus (1991). El proceso comienza identificando y seleccionando el espectro con mayor número de vecinos y eliminando éstos. Con las muestras restantes repite el proceso hasta que ningún espectro tiene otros a una distancia  $H < 0,6$ .

Las muestras elegidas mediante el algoritmo SELECT se analizaron aplicando los métodos químicos y biológicos descritos anteriormente. Con los resultados, se obtuvieron las ecuaciones de calibración, utilizadas para la predicción de las muestras restantes.

### II.3.2.7.5.c Ecuaciones de calibración

Se utilizó el método de mínimos cuadrados parciales modificado (Shenk y Westerhaus 1991), ya que en forrajes ha mostrado una mayor precisión en las ecuaciones obtenidas que el método clásico de regresión lineal múltiple. Las características de las ecuaciones de calibración para las distintas determinaciones analíticas se resumen en la **Tabla II.3.2.7**.

**Tabla II.3.2.7** Términos estadísticos de las ecuaciones de calibración NIR y de la validación cruzada utilizadas en la predicción de la composición química de la materia seca de las muestras obtenidas en los ensayos.

	Nº	SEC	R <sup>2</sup> C	SECV	R <sup>2</sup> CV	RPD
Cenizas	145	10,37	0,64	11,29	0,58	1,54
PB	164	8,58	0,95	9,37	0,94	3,94
NDF	172	1,65	0,93	1,8	0,91	3,48
ADF	173	12,4	0,94	13,8	0,92	3,56
ADL	170	7,08	0,71	7,62	0,66	1,71
TC	136	0,27	0,86	0,32	0,80	2,23

N = Nº de muestras utilizadas en el proceso de calibración; SEC = error estándar de las muestras del grupo de calibración; R<sup>2</sup>C = coeficiente de determinación de calibración; SECV = error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup>CV = coeficiente de determinación de validación cruzada; RPD = desviación residual de predicción.

## II.4 Análisis estadísticos

El ensayo se sembró según un diseño en bloques al azar con 3 repeticiones. Se organizó en parcelas divididas: la variedad y año constituían las parcelas principales y los cortes las parcelas divididas. Los valores en porcentaje (mortalidad, intensidad de floración) fueron transformados por arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis estadístico, así como los datos obtenidos mediante escala de 0 a 5 (incidencia de oídio). Se comprobó la normalidad de los datos y de los residuos mediante un test de Shapiro-Wilk.

### II.4.1 Análisis de la varianza

Para las determinaciones de porte, producción de materia seca, mortalidad, y las correspondientes a la composición química del forraje obtenido, el análisis de la varianza se llevó a cabo en base a un modelo en split-split-plot con los siguientes factores:

El factor año (2008 y 2009): Se consideró como factor fijo, ya que dos años no son una muestra suficiente para extrapolar los resultados a otras campañas y ser considerados como una muestra aleatoria representativa de la variación anual.

Los factores ‘variedad’ y ‘corte’: Al igual que el factor año fueron considerados como fijos.

El factor ‘bloque’: Se consideró como factor aleatorio.

Descripción del modelo.

$$\gamma_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + \epsilon_{1ij} + V_k + (V*A)_{ik} + \epsilon_{2ik} + C_l + (C*A)_{il} + (C*V)_{kl} + (C*V*A)_{ikl} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde A = año, B = bloque, V = variedad y C = corte.

Para el análisis de la varianza de las determinaciones de intensidad de floración y plagas y enfermedades, se utilizó el siguiente modelo:

$$\gamma_{ij} = \mu + V_i + B_j + \epsilon_{ij}$$

Al igual que para el resto de determinaciones, el factor variedad fue considerado como fijo, mientras que el factor bloque se consideró como aleatorio.

Para el análisis de la varianza de la precocidad, se utilizó el siguiente modelo:

$$\gamma_{ijk} = \mu + A_i + B_j + \epsilon_{1ij} + V(O)_k + [V(O)*A]_{ik} + \epsilon_{ik}$$

Donde el factor 'variedad' es un factor fijo jerarquizado al factor 'origen', O (según si las variedades son españolas o foraneas), el factor 'año' un factor fijo y el factor 'bloque' se consideró aleatorio.

La relación entre las diferentes variables, así como entre la mortalidad y la temperatura, se evaluó mediante un análisis de correlación. Para ello se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Los valores en porcentaje (mortalidad, intensidad de floración) fueron transformados por arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis estadístico, así como los datos obtenidos mediante escala de 0 a 5 (incidencia de oídio). Se comprobó la normalidad de los datos y de los residuos mediante un test de Shapiro-Wilk.

Los análisis de la varianza se realizaron mediante el procedimiento 'proc mixed' del paquete estadístico SAS (SAS 2004).

#### **II.4.2 Análisis de componentes principales**

Se llevó a cabo dos análisis de componentes principales con la finalidad de integrar los datos e identificar los parámetros explicativos de la variación observada. El primero se realizó sobre el porte medio de las variedades, la producción total, la intensidad de floración en 2007, la incidencia de oídio y la mortalidad total. Dicho análisis de componentes principales se completó con la construcción de dendrogramas (método UPGMA) para la determinación de los clústers que fueron caracterizados con el test de comparación de medias (test de la t de Student, unpaired). El segundo análisis de componentes principales se realizó sobre el conjunto de los precedentes datos asociados a la media de los parámetros de composición química. Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico Minitab (Minitab 2003).

### III RESULTADOS

La relación de datos correspondientes a este Ensayo se presenta en el **Anexo 1**.

#### III.1 Características agronómicas.

En el **Anexo 1, Tablas 1, 2 y 3**, se recogen los resultados correspondientes a los diferentes parámetros agronómicos estimados para cada variedad y corte. En la **Tabla 1**, se presentan los correspondientes a la intensidad de la floración y a la incidencia del oídio; en la **Tabla 2**, el porte de las plantas y en la **Tabla 3**, la producción de MS por planta.

En la **Tabla III.1** se muestra, para cada parámetro, la significación de los factores y de la varianza explicada por cada factor.

**Tabla III.1** Varianza explicada (% de la suma de cuadrados) en el análisis de varianza de los diferentes factores para los parámetros ‘intensidad de floración (IF)’ y ‘nivel de infección por oídio’ en 2007 y ‘porte’, ‘producción de materia seca (PMS)’ y ‘mortalidad’ en 2008 y 2009.

Fuente de variación	GL	IF		Oídio		GL	Porte		PMS		Mortalidad	
Total	68					681						
Año						1	3,0	***	4,2	***	0,2	ns
Corte						4	33,7	***	75,8	***	16,0	***
Variedad	22	83,2	***	36,2	ns	22	12,4	***	2,7	***	1,2	ns
Año*Corte						4	5,5	***	4,8	***	5,3	***
Año*Variedad						22	1,3	ns	0,7	***	2,5	ns
Corte*Variedad						88	14,6	***	4,3	***	13,1	**
Año*Corte*Variedad						88	4,3	ns	2,7	***	15,4	***
Error	46	16,8		63,8		452	25,1		4,9		46,3	

GL: grados de libertad; ns, \*, \*\*, \*\*\* significación de la F al nivel de probabilidad  $P > 0,05$ ;  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente.

##### III.1.1 Intensidad de floración

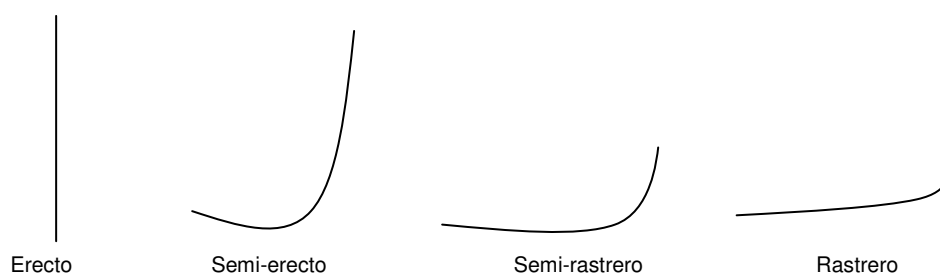
La intensidad de floración para cada variedad, en 2007, se presenta en la **Tabla 1 del Anexo 1**. El factor ‘variedad’ afectó significativamente a la intensidad de floración ( $P < 0,001$ ). La intensidad de la floración varió del 14,2% para la variedad ‘Cotswold Common’ al 91,4% para ‘Reznos’, siendo la intensidad de floración media de las variedades en el año de establecimiento del  $74,4 \pm 21,2\%$  (coeficiente de variación  $CV = 30,1\%$ ).



**Figura III.1.1** Tres plantas de la variedad 'Incoronata' simultáneamente en inicio de floración, estado vegetativo y botón floral, en septiembre 2007.

### III.1.2 Porte

El porte de cada variedad en los diferentes cortes realizados durante 2008 y 2009 se muestra en la Tabla 2. Las plantas presentaron una amplia variación en el porte, desde rastrero a erecto, cuyas representaciones esquemáticas se muestran en la **Figura III.1.2 a y b**.



**Figura III.1.2.a** Esquemización de los diferentes portes descritos desde erecto a la izquierda, a rastrero a la derecha.



**Figura III.1.2.b** Variación en el porte de distintas variedades de esparceta, desde erecto a la izquierda, a rastrero a la derecha, durante la primavera de 2008.

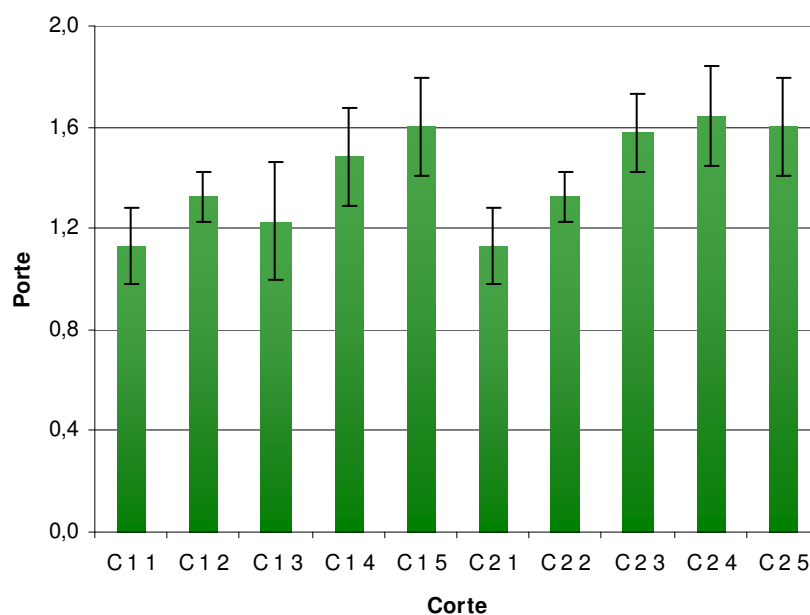
La estimación del porte como la relación entre la altura y el radio de las plantas reveló ser una medición más objetiva que la apreciación visual.

El porte medio por variedad en todos los cortes de los dos años osciló entre 1,97 y 0,83, siendo la media de  $1,4 \pm 0,25$ , lo que correspondería a las plantas semi-erectas.

El porte se vio afectado por los factores ‘variedad’, ‘corte’, ‘año’ y por las interacciones ‘corte\*año’ y ‘variedad\*corte’. El factor ‘corte’ explicó el 34% de la varianza observada. Las plantas fueron cada vez más erectas de C1 a C5 (**Fig. III.1.2.c**). En C1.3 (tercer corte del 2008), las plantas presentaron un porte medio más rastrero que en C12 o en C14.

El porte también se correlacionó significativamente con la intensidad de floración ( $P < 0,001$ ,  $R^2 = 0,32$ ); las plantas que más florecieron mostraron tendencia a presentar un porte más erecto.

Durante el primer corte de 2008, el factor ‘variedad’ afectó al porte significativamente. Las variedades ‘Korunga’ y ‘Polonia’ presentaron el porte más rastrero, 0,832 y 0,890 respectivamente, mientras que ‘Visnovsky’ y ‘Reznos’ tuvieron el porte más erecto, 1,362 y 1,355 respectivamente. El orden de las variedades se repitió en el primer corte de 2009 aunque el porte medio anual de 2008 fue menos erecto que el de 2009.



**Figura III.1.2.c** Evolución del porte de una colección de esparcetas según el corte, durante el periodo 2008-2009.

### III.1.3 Fecha de corte

En la **Tabla III.1.3.a** se resumen los datos relativos a la fecha de los cortes realizados durante 2008 y 2009.

**Tabla III.1.3.a** Fechas de los cortes, duración media y temperaturas medias del periodo entre cortes.

Año	Corte	Fecha de corte (calendario)		Periodo entre cortes (días)	T <sup>a</sup> media (°C)
		Inicio	Final		
2008	1 <sup>º</sup>	13-abr.	30-abr.		9,4
	2 <sup>º</sup>	04-jun.	18-jun.	46	16,6
	3 <sup>º</sup>	02-jul.	16-jul.	34	22,8
	4 <sup>º</sup>	12-sept.	15-sept.	68	22,3
	5 <sup>º</sup>	15-nov.	18-nov.	61	14,1
	1 <sup>º</sup>	04-may.	15-may.		7,9
	2 <sup>º</sup>	09-jun.	24-jun.	37	20,5
	3 <sup>º</sup>	09-jul.	14-jul.	26	23,8
	4 <sup>º</sup>	22-sept.	24-sept.	70	23,3
2009	5 <sup>º</sup>	24-nov.	26-nov.	65	14,2

Cada variedad se segó en el estado de plena floración, por lo que existe variación en la fecha de corte de cada variedad. En el segundo año, el primer corte se retrasó de media casi 20 días. Este retraso repercutió en los periodos comprendidos entre el C1 y el C2, y entre el C2 y el C3, los cuales fueron más cortos el segundo año.

La duración de los cortes, o sea el tiempo entre el corte de la variedad más precoz y el de la variedad más tardía, fue alrededor de 14 días en los cortes C1, C2 y C3 pero se redujo a 3 - 4 días en C4 y C5.

La fecha del primer corte de cada año se puede considerar como una estimación de la precocidad de las variedades. Hubo un intervalo de hasta 17 días entre la variedad más precoz y la más tardía. Las variedades locales fueron las más precoces, ya que florecieron, de media, en los 4,3 primeros días del intervalo; las variedades foráneas fueron las más tardías, floreciendo a los 11 días de media del intervalo. Los dos grupos se mostraron claramente diferenciados mediante análisis de varianza ( $P < 0,001$ ). Destacaron dentro de ambos grupos, 'Sepial' con una precocidad de 2 días dentro del grupo de las variedades foráneas y 'Selección 7.1' y 'Torrecilla de Cameros', como las variedades locales que tuvieron una floración más tardía (13 y 8 días respectivamente), (**Tabla III.1.3.b**).

**Tabla III.1.3.b** Precocidad media en días desde el inicio del primer corte de 2008 y 2009 (DE desviación estándar)

Variedad	Media	DE	Variedad	Media	DE
Cotswold Common	6,0	0,0	Selección 9.2	2,5	0,7
Somborne	6,0	0,0	Reznos	6,0	0,0
Esparcette	10,5	6,4	Selección 7.1	13,0	5,7
Sepial	2,0	1,4	Mezquita de Jarque	3,5	2,1
Ambra	15,0	0,0	Lagueruela	3,5	2,1
Fakir	8,5	0,7	Loarre	3,0	2,8
Ucrania	10,0	2,8	Villahoz	3,5	2,1
Incoronata	9,0	8,5	Torrecilla de Cameros	8,0	0,0
Visnovsky	16,5	0,7	Graus	1,5	0,7
Yubileyna	16,0	1,4	Tartareu	2,5	0,7
Korunga	16,5	0,7	Villahermosa del río	1,0	0,0
Polonia	16,0	1,4			
Variedades foráneas	11,0	4,9	Variedades españolas	4,4	3,5

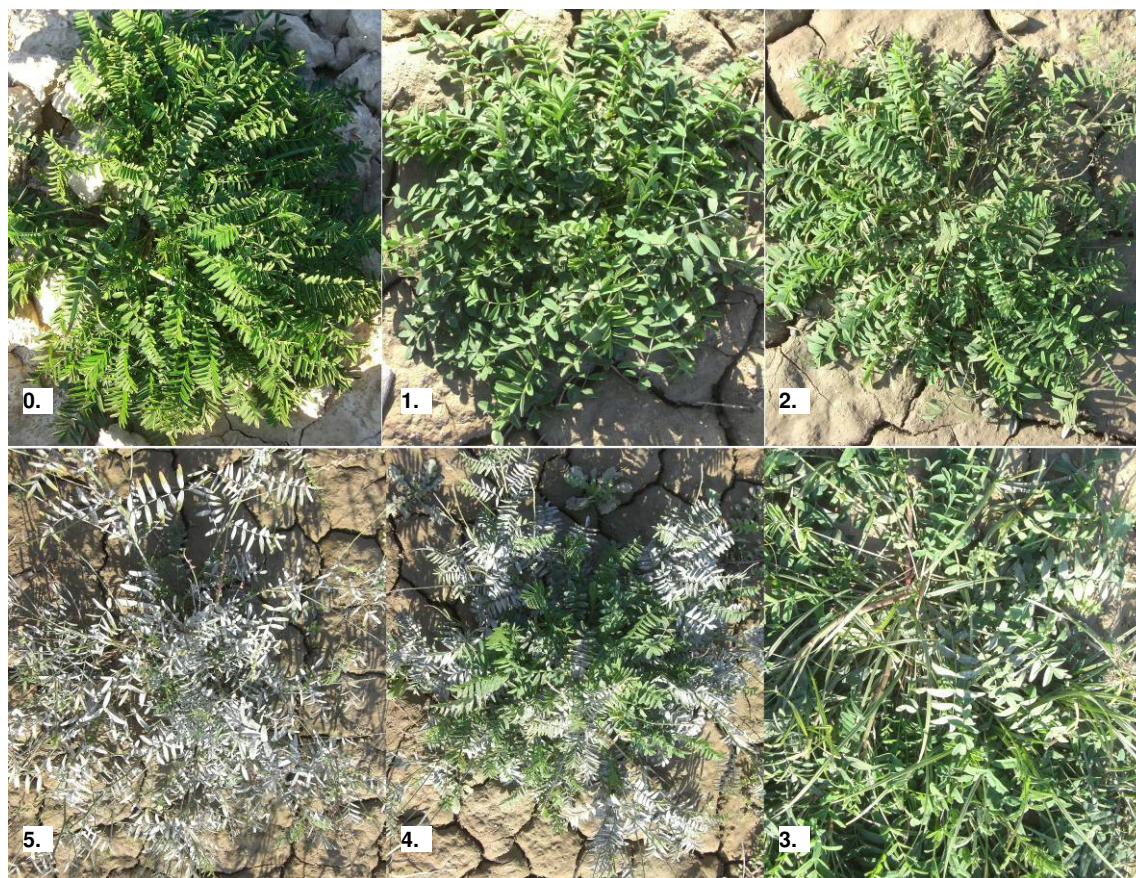
El factor ‘año’ no afectó significativamente a la precocidad, sin embargo el factor ‘variedad’ explicó el 87% de la variabilidad observada.

La precocidad se correlacionó significativamente con la producción de MS ( $P= 0,013$ ,  $r = 0,36$ ) pero no con la intensidad de floración o el porte.

### III.1.4 Plagas y enfermedades

No se apreciaron daños producidos por plagas, a pesar de que se encontraron pulgones de forma aislada, orugas, trips, caracoles etc.: en ningún momento se apreció una proliferación de los mismos ni daños en las plantas.

La única enfermedad con incidencia notable en el periodo 2007-2009 fue el oídio (*Erysiphe* sp.). Los efectos ya se observaron en 2007; en julio se apreciaron indicios de oídio en las hojas y en septiembre su presencia visual se generalizó a la práctica totalidad del ensayo. El 10 septiembre del 2007, el nivel de infección fue de 3,7 de media, oscilando entre 3,1 para ‘Cotswold’ y 4,4 para ‘Visnosky’ (**Figura III.1.4**).



**Figura III.1.4** Diferentes niveles de infección por oídio, de ‘0’ a ‘5’, en septiembre de 2007.

La incidencia de la enfermedad no estuvo afectada significativamente por el factor ‘variedad’ pero si por la ‘intensidad de floración’ de las plantas ( $r= 0,46$ ). Las más desarrolladas presentaron mayor superficie afectada. El nivel de contaminación por oídio no estuvo correlacionado ni con la producción de MS ni con el porte pero si con la mortalidad ( $P=0,006$ ), habiendo menor mortalidad en las plantas con mayor contaminación ( $r= 0,33$ ).



La roya (*Uromyces onobrychidis*) se manifestó débilmente por lo que no se evaluó su incidencia.

No se encontraron síntomas visibles de virus en las plantas de esparceta ni en hojas ni en tallos.

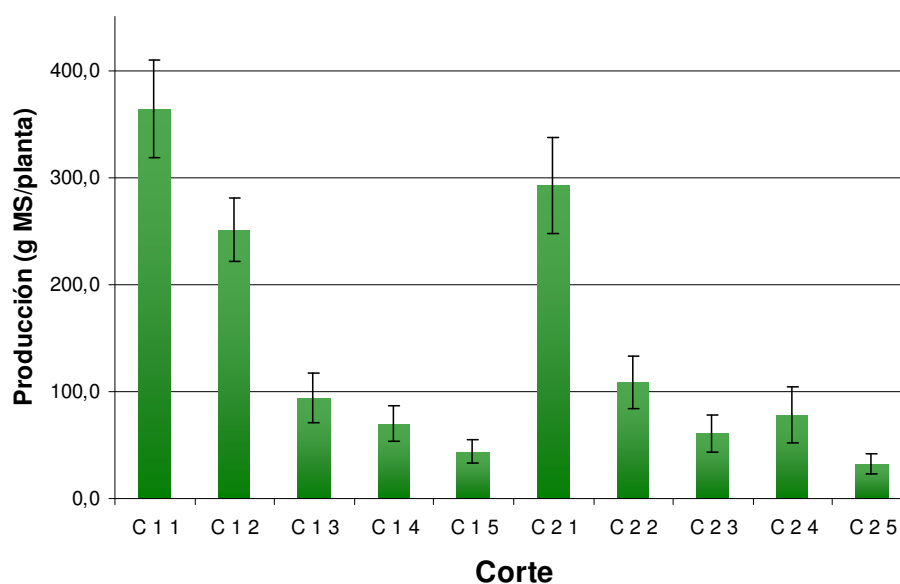
### III.1.5 Producción de MS por planta

La producción total media de MS por planta en cada variedad, de los dos años de producción, y la producción media por corte, se presenta en el **Anexo 1, Tabla 3**.

La mayor producción total en los dos años correspondió a ‘Polonia’ con 1776 g MS/planta, y la menor a ‘Cotswold Common’ con 1041 g MS/planta, siendo la media por variedades de 1395 g MS/planta. La producción declinó desde el primero al último corte (C1 a C5), siendo la proporción de cada corte sobre la producción anual del 43%, 31%, 12%, 9% y 5% respectivamente, en el 2008, y del 51%, 19%, 11%, 14% y 6% respectivamente, en 2009. El factor ‘corte’ explicó el 76% de la variabilidad encontrada en la producción de MS de la esparceta.

Algunas variedades presentaron un reparto diferente de la producción: ‘Korunga’, ‘Yubileyna’, ‘Polonia’, ‘Reznos’ y ‘Visnovsky’ tuvieron una contribución proporcionalmente más alta de producción en los cortes C1 y C2 que la media de las variedades. Estas variedades fueron también las más productivas. Por otra parte, ‘Laguera’, ‘Torrecilla de Cameros’, ‘Selección 7.1’ y ‘Fakir’ mostraron menos variación de producción entre cortes.

La producción de MS fue más baja en 2009 que en 2008 (822 g MS/planta vs 572 g MS/planta) y el segundo corte tuvo un aporte mayor a la producción total en 2008 que en 2009. La producción de MS se vio afectada significativamente por los factores ‘variedad’, ‘corte’ y ‘año’, así como por las interacciones ‘año\*corte’, ‘año\*variedad’, ‘corte\*variedad’ y ‘año\*corte\*variedad’.

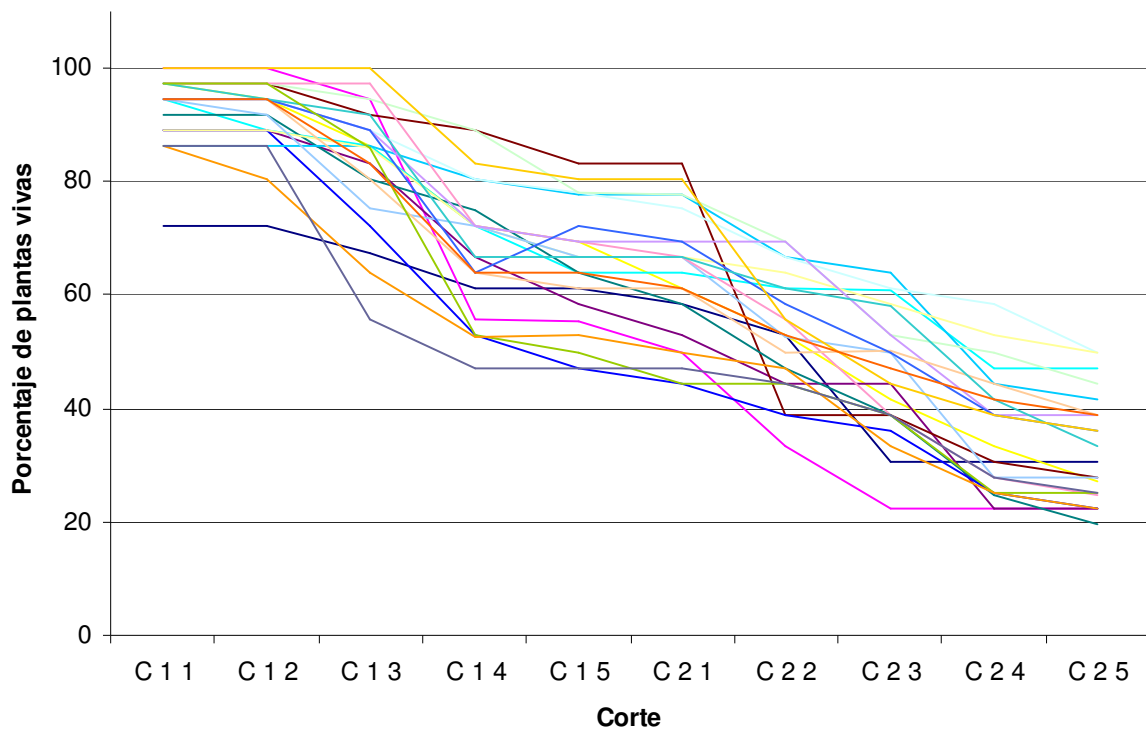


**Figura III.1.6** Distribución por cortes de la producción anual de materia seca de una colección de esparcetas (media de 23 variedades), durante el periodo 2008-2009.

La producción de MS se correlacionó con la intensidad de floración; las variedades que tuvieron mayor intensidad de floración fueron las que tuvieron mayor producción ( $P < 0,001$ ,  $R^2 = 0,245$ ).

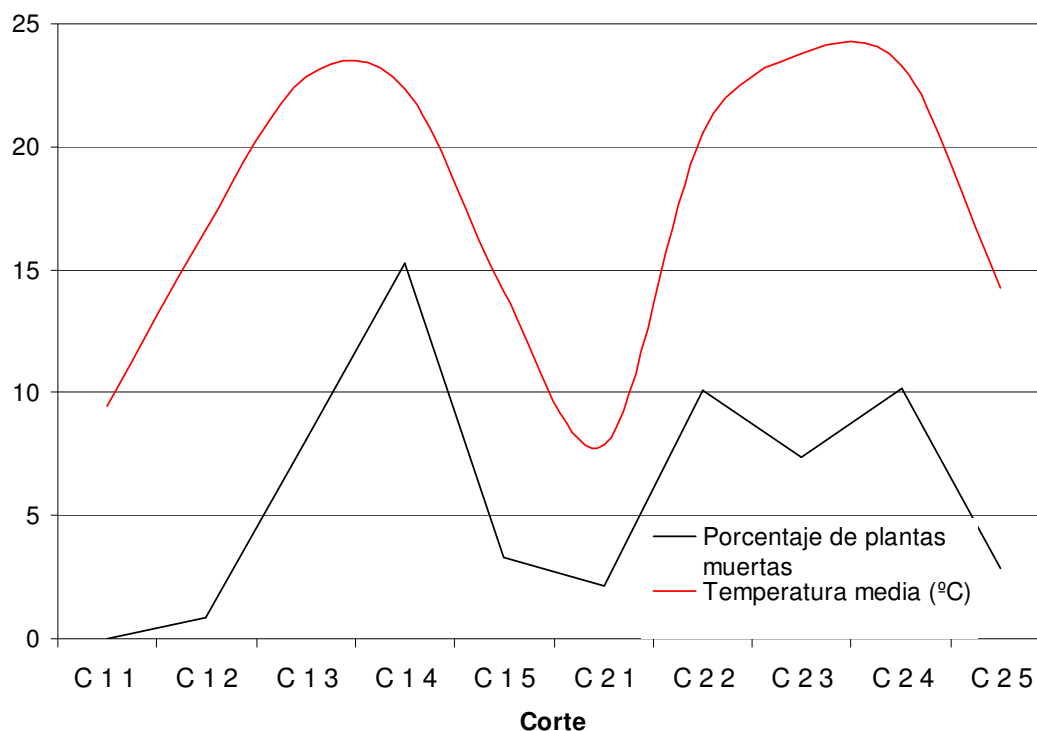
### III.1.6 Mortalidad

La evolución de la mortalidad de las plantas durante el periodo de ensayos se muestra en la **Tabla 4 del Anexo 1**. Dicha mortalidad osciló entre el 50% de plantas muertas ('Yubileyna', 'Polonia') y el 78% ('Somborne', 'Ambar') al cabo de los tres años. La mortalidad total no se vio afectada por el factor 'variedad' y no presentó correlaciones significativas con la producción de MS, el porte y la intensidad de floración. Las mortalidades anuales en 2008 y 2009 no presentaron diferencias significativas entre variedades.



**Figura III.1.5.a** Evolución de la mortalidad en una colección de esparcetas a lo largo de los cortes, periodo 2008-2009.

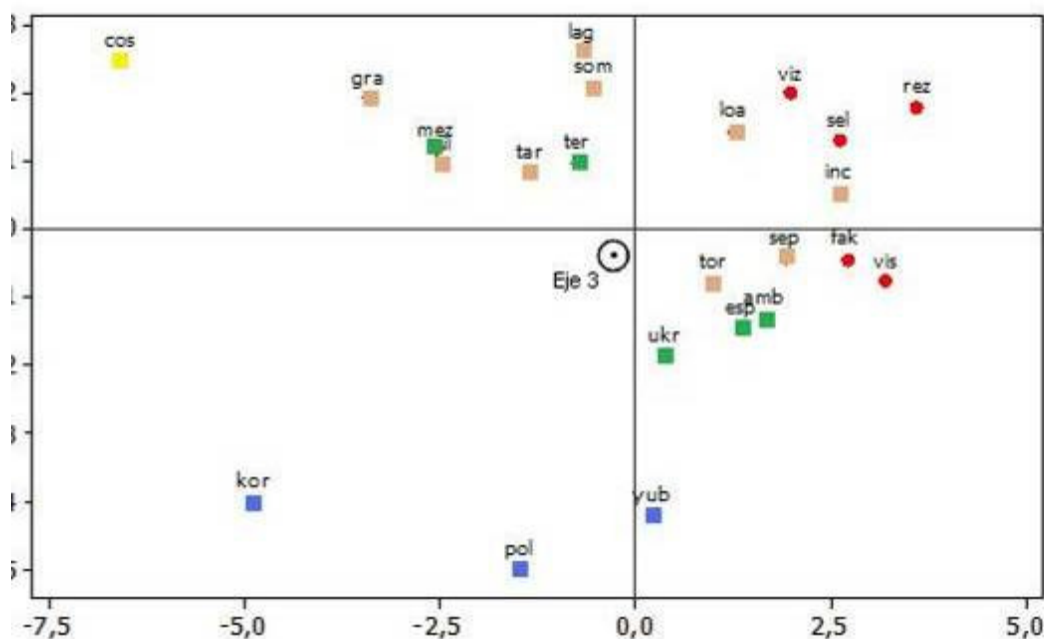
El factor 'corte' y su interacciones 'corte\*variedad' y 'corte\*año' fueron significativas; hubo mayor mortalidad en los cortes de verano: C3 y C4 en 2008, y C2, C3 y C4 en 2009, según muestra la **Figura III.1.5.b**



**Figura III.1.5.b** Evolución de la mortalidad en una colección de esparcetas en relación con las temperaturas medias entre cortes, periodo 2008-2009.

### III.1.7 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) realizado con los parámetros evaluados, utilizando los diferentes datos obtenidos sobre intensidad de floración, porte, producción de MS, incidencia de oídio y mortalidad, asociado a la construcción de un dendograma según el método UPGMA, permitió segregar las variedades en cinco grupos (**Figura III.1.7**).



**Figura III.1.7** Análisis de componentes principales discriminando variedades de una colección de esparceta según criterios agronómicos.

El eje 1 estuvo influenciado principalmente por los criterios ‘intensidad de floración’ y ‘porte’, el eje 2 por el criterio ‘mortalidad’ y el eje 3 por el criterio ‘producción de MS’. Los ejes explicaron respectivamente 33,9 %, 22,8 % y 14,7 % de la varianza observada.

Los distintos grupos que se distinguieron por diferencias significativas en sus características agronómicas estudiadas, fueron (**Tabla III.1.7**):

- grupo A: incluyendo solo ‘Costwold Common’ de intensidad de floración muy baja, producción baja, porte semi-rastrero y mortalidad alta
- grupo B: ‘Somborne’, ‘Incoronata’, ‘Lagueruela’, ‘Loarre’, ‘Graus’, ‘Tartareu’, ‘Torrecilla de Cameros’, ‘Villahermosa del Río’ y ‘Sepial’ de producción mediana, porte semi-erecto y de mortalidad e intensidad de floración alta
- grupo C: ‘Fakir’, ‘Visnosky’, ‘Reznos’, ‘Selección 7.1’ y ‘Villahoz’ de intensidad de floración, producción y mortalidad alta y porte erecto
- grupo D: ‘Selección 9.2’, ‘Ambra’, ‘Esparcette’, ‘Mezquita de Jarque’ y ‘Ukrania’ de producción media, porte erecto, intensidad de floración y mortalidad alta
- grupo E: ‘Yubileyna’, ‘Polonia’ y ‘Korunga’ de intensidad de floración y producción alta, porte semi-erecto y mortalidad baja.

**Tabla III.1.7** Caracterización de los grupos de esparcetas formados por PCA según criterios agronómicos durante el periodo 2008-2009.

<b>Grupos</b>	<b>Intensidad de floración</b>	<b>Producción</b>	<b>Porte</b>	<b>Mortalidad</b>
<b>A</b>	14,2 a	1046,7 a	1,17 a	69,4 ab
<b>B</b>	72,4 b	1336,5 b	1,39 b	68,5 a
<b>C</b>	82,7 b	1512,7 c	1,46 c	70,5 a
<b>D</b>	80,9 b	1302,7 b	1,48 c	70,6 a
<b>E</b>	76,0 b	1595,2 c	1,32 ab	51,9 b

### III.2 Composición química de la MS

En las **Tablas 5, 6, 7, 8, 9 y 10 del Anexo 1**, se presentan los resultados de la composición química de la MS, correspondientes a los diferentes parámetros analizados (Cz, FND, FAD, LAD, PB y TC) para cada variedad y corte. En la **Tabla III.2** se muestra para cada parámetro, la significación de los factores y la varianza explicada por cada factor. Las interacciones entre criterios agronómicos y determinaciones de la composición química se muestran en la **Tabla 11 del Anexo 1**.

**Tabla III.2** Varianza explicada (% de la suma de cuadrados) en el análisis de varianza por los diferentes factores para las determinaciones de cenizas (Cz), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD), proteína bruta (PB) y taninos condensados (TC) en 2008 y 2009.

Fuente de variación	GL	Cz	FND	FAD	LAD	PB	TC
Total	635						
Año	1	3,6 ***	1,2 ***	0,9 ***	1,2 ***	4,6 ***	2,9 ***
Corte	4	55,6 ***	25,2 ***	64,9 ***	64,8 ***	57,0 ***	44,7 ***
Variedad	22	2,2 ***	4,9 ***	2,9 ***	2,6 ***	2,8 ***	5,2 ***
Año*Corte	4	11,6 ***	28,0 ***	4,6 ***	3,8 ***	4,5 ***	5,0 ***
Año*Variedad	22	1,0 ns	1,6 *	1,4 *	0,9 ns	1,9 ***	1,4 ns
Corte*Variedad	88	5,4 **	10,1 ***	7,7 ***	6,3 ***	7,9 ***	8,8 ***
Año*Corte*Variedad	88	4,7 *	13,1 ***	5,0 ***	4,5 *	7,2 ***	6,8 ns
Error	406	15,9	15,9	12,5	15,9	14,1	25,3

GL: grados de libertad; ns, \*, \*\*, \*\*\* significación de la F al nivel de probabilidad  $P > 0,05$ ;  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente.

#### III.2.1 Contenido en PB

El contenido en PB se vió afectado por todos los factores e interacciones. El factor 'corte' tuvo la mayor relevancia, explicando el 57% de la variación observada. El contenido en PB aumentó del primero al quinto corte con la excepción notable del cuarto corte que experimentó un descenso con respecto al tercer corte; dichos contenidos fueron del 16,5%, 18,1%, 19,4%, 16,8% y 24,2% respectivamente. El contenido en PB fue más alto en 2008 que en 2009, 19,8% vs 18,1%, debido a las diferencias significativas habidas en el C1, 18,2% en 2008 y 14,8% en 2009, y en el C4, 18,5% en 2008 y 14,9% en 2009. El contenido en PB medio de las variedades estuvo correlacionado negativamente con la intensidad de floración y con el porte ( $R^2=0,10$ ,  $R^2=0,12$ ).

#### III.2.2 Contenido en cenizas

El contenido en Cz fue de 9,75% de media. Este valor estuvo afectado significativamente por los factores 'año', 'corte' y 'variedad' y por las interacciones 'año\*corte' y 'corte\*variedad'. El factor 'corte' tuvo la mayor relevancia y explicó el 56% de la variación observada, cuando factor 'variedad' explicó solamente el 2% de la variación observada.

El contenido en Cz mostró un incremento del primero al cuarto corte, siendo del 7,8%, 8,7%, 9,7%, 11,3% y 11,3% respectivamente. El contenido en Cz fue superior en el 2008 debido a un contenido superior en el primer corte de este año, 9,4% vs 6,5%.

El contenido en Cz se correlacionó negativamente con la producción de MS ( $P < 0,001$ ,  $R^2=0,29$ ) y positivamente con el porte ( $P < 0,001$ ,  $R^2=0,19$ ).

### III.2.3 Contenido en FND

El contenido en FND estuvo afectado significativamente por todos los factores e interacciones excepto por la interacción ‘año\*variedad’. Sin embargo, el factor ‘corte’ y las interacciones donde éste estuvo implicado (año\*corte, corte\*variedad y año\*corte\*variedad) tuvieron mayor peso, logrando explicar el 76% de la variación observada. El contenido en FND descendió del primer al quinto corte con la excepción notable del cuarto corte, 43,2%, 41,3%, 38,8%, 45,2% y 34,7% de media en dos años respectivamente. El contenido medio de NDF en 2009 fue significativamente más bajo ( $P=0,004$ ) que el obtenido en 2008, la mayor diferencia se produjo en el quinto corte, 42,6% en 2008 vs 25,5% en 2009.

### III.2.4 Contenido en FAD

El contenido en FAD estuvo afectado por todos los factores y sus interacciones, siendo otra vez el factor ‘corte’ el que tuvo mayor peso explicativo (64,9% de la variación observada). El contenido en FAD fue similar entre los cortes C1 y C2, pero decreció en los siguientes cortes, de 31% en C1 y C2 a 20,5% en C5. El contenido en FAD estuvo positivamente correlacionado con el nivel de producción de MS ( $P<0,001$ ,  $R^2=0,31$ ) y negativamente con el porte ( $P<0,001$ ,  $R^2=0,16$ ).

### III.2.5 Contenido en LAD

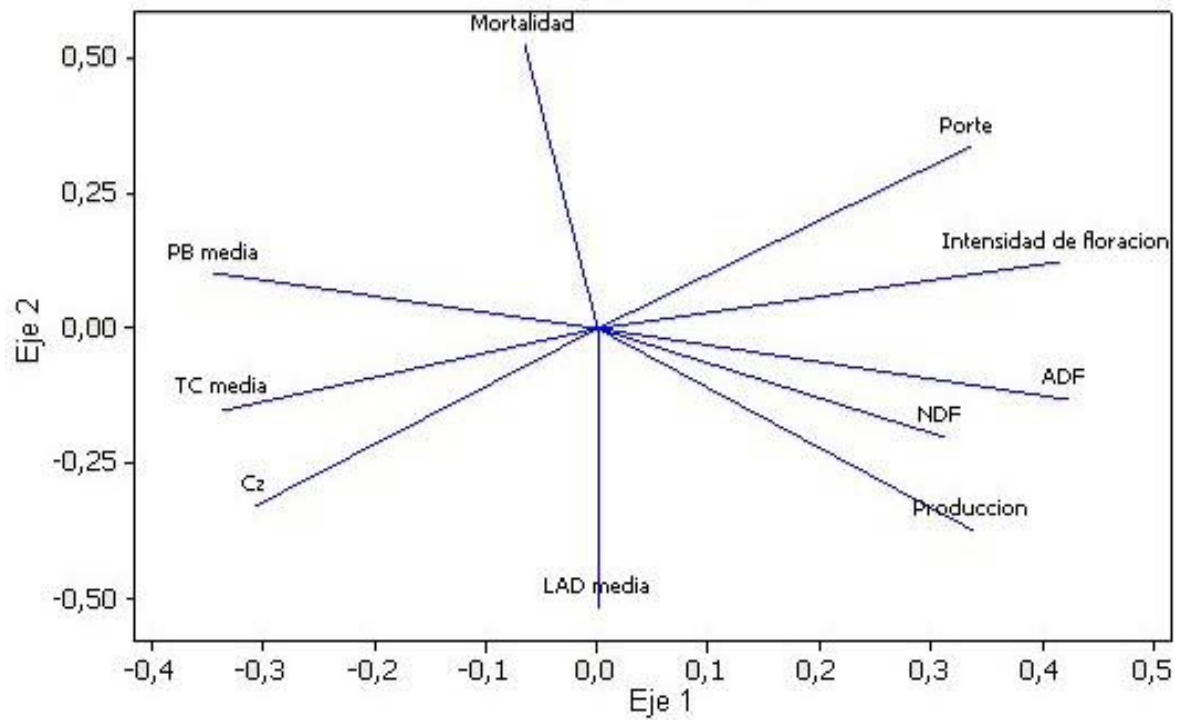
El factor ‘corte’ fue el que influyó sobre el contenido en LAD, explicando el 64,8% de la variación observada. Los demás factores e interacciones, salvo la interacción ‘año\*variedad’, afectaron significativamente al contenido en LAD, pero tuvieron un peso menor (< del 5% de la varianza explicada). El contenido en LAD estuvo positivamente correlacionado con la producción de MS y el porte siendo los coeficientes de correlación muy débiles ( $R^2=0,11$  y  $R^2=0,06$ ).

### III.2.6 Contenido en TC

Los factores ‘año’, ‘variedad’, ‘corte’ y las interacciones ‘año\*corte’ y ‘corte\*variedad’ afectaron significativamente al contenido en TC. El factor ‘corte’ explicó el 44,7% de la variación observada. El contenido en TC fue similar en los dos primeros cortes, 1,3%, aumentó en C3, C4 y C5 donde alcanzó valores del 2,0%, 2,66% y 2,26% respectivamente. El contenido en TC de las plantas fue superior en 2009, 2,03% vs 1,79% en 2008, debido a los incrementos habidos en C2, C3 y C5; sin embargo, el contenido en TC fue menor en C4. El contenido en TC medio estuvo correlacionado negativamente con la intensidad de floración y con el porte ( $R^2=0,08$ ,  $R^2=0,12$ ).

### III.2.7 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales efectuado para estudiar el comportamiento de las variedades según criterios agronómicos y de composición química, determinó dos ejes principales explicando el 58% de la variación observada (**Figura III.2.7**). El primer eje asoció el porte, la intensidad de floración, la producción de MS y los contenidos en FAD y FND, correlacionados negativamente con los contenidos en PB, TC y Cz. El segundo eje incluyó la mortalidad, correlacionada negativamente con el contenido en LAD. Las variedades que tuvieron la mayor intensidad de floración fueron las más productivas, con tendencia a un porte más erecto y un contenido en fibras FND y FAD mayor y un contenido en PB y TC menor.



**Figura III.2.7** Análisis de componentes principales según criterios agronómicos y de composición química de una colección de esparcetas, periodo 2007-2009.

## IV. DISCUSIÓN

### IV.1 Características agronómicas.

#### IV.1.1 Intensidad de floración

A pesar de las numerosas referencias a la existencia de esparcetas de un corte o de dos cortes (Badoux 1965; Michelena 1983), la mayoría de las variedades presentaron unas características agronómicas intermedias en nuestra colección. Pocas variedades se pudieron identificar estrictamente como de uno u otro tipo, entre ellas, ‘Cotswold common’ y ‘Graus’, que presentaron una intensidad de floración menor del 30% de plantas florecidas en el año de establecimiento lo que las identifica como de ‘un corte’, mientras que ‘Reznos’ y ‘Sepial’, con una intensidad de floración superior al 90%, serían del tipo ‘dos cortes’. La intensidad de floración media de las variedades fue del 74% en 2007, lo que se aproxima más al tipo ‘dos cortes’.

Los resultados alcanzados sobre las variedades locales divergen de los presentados por Michelena (1983), en los cuales las variedades clasificadas como de ‘un corte’ o de ‘dos cortes’ incluían como máximo un 10% de plantas del otro tipo. Asimismo, Badoux (1965) describió variedades comerciales que se aproximaban a las de ‘un corte’ y ‘dos cortes’ mientras que la totalidad de las variedades silvestres suizas fueron de ‘un corte’. Este último autor cita a Bawolsky (1961) y señala que “la formación de inflorescencia en el primer año depende de la longitud del día y quizá también de la temperatura. [...], así como que es posible hacer florecer en el año de siembra una variedad de un corte disminuyendo a 12 horas el periodo diario de iluminación en el momento de la germinación”, por lo que aconseja sembrar las plantas en febrero en invernadero y trasplantarlas al campo al inicio del mes de mayo para conseguir este resultado.

En nuestro caso, las plantas se sembraron a finales de marzo y se trasplantaron el 15 de junio, lo que se estima demasiado tarde para que se haya producido la inducción en días cortos que parece necesitar la esparceta. Ello podría explicarse por las diferencias en las condiciones del cultivo (regadío y un verano largo y caluroso) que han podido influir sobre el nivel de floración. Delgado *et al.* (2008b) encontraron una intensidad de floración más alta en condiciones de regadío que en secano en una misma variedad, ‘Fakir’.

La coexistencia en la misma especie de dos tipos de plantas, las que florecen y las que no florecen el año de corte, ha dado lugar a una elevada heterogeneidad en la semilla que se presenta en el comercio debido a que la selección de variedades comerciales por parte de las casas de semillas es escasa y es frecuente el intercambio de semillas entre agricultores. Como consecuencia de ello, en las semillas comercializadas o en las proporcionadas por los agricultores están presentes tres tipos de esparcetas, de un corte, dos cortes e intermedias, como ha sido puesto de manifiesto por Michelena (1983) y Delgado *et al.* (2008b).

Por último, también ha podido contribuir a debilitar la manifestación del carácter ‘esparceta de un corte’ o ‘esparceta de dos cortes’, un manejo inapropiado de las variedades en la producción de semilla. De hecho, existen dos modalidades para la recolección de semilla: cosecha de la semilla en el primer corte del último año productivo o una cosecha para semilla del rebrote después del primer corte, en los veranos más lluviosos. En el primer caso, se ejerce una presión de selección sobre plantas de ‘un corte’, más persistentes; en el segundo caso, se favorece al tipo ‘dos cortes’, que presenta mayor intensidad de floración durante el rebrote.



Del mismo modo, la práctica de dejar el último año del cultivo para la producción de semilla va hacia selección de plantas de un corte; la persistencia del cultivo está ligada a plantas de un corte, según Badoux (1965).

Ambas prácticas, habituales en las zonas españolas donde se produce semilla, han favorecido la permanencia de variedades de ‘un corte’, como es el caso de la provincia de Teruel y algunas comarcas de Huesca, y de dos cortes en las provincias de Palencia, Burgos y Soria (Delgado *et al.* 2008b).

#### **IV.1.2 Porte**

El diseño del ensayo en plantas aisladas a 1 x 0,40 cm pudo facilitar el desarrollo pleno de las plantas, las cuales mostraron una gran amplitud de reparto del volumen, encontrándose, por ejemplo, plantas, que con una longitud de tallos de 100 cm, no sobrepasaron los 20 cm de altura y otras que con la misma longitud permanecían completamente erectas. Por ello se prefirió el criterio ‘porte’, frente a un criterio ‘longitud de los tallos, ya que permite transcribir mejor la morfología de las plantas.

A lo largo del año, las plantas fueron cada vez más erectas del C1 al C5, ya que al alcanzar menor altura y ser el peso de los tallos menor, redujeron el riesgo de tumbarse y las plantas pequeñas no se abrieron tanto con el peso de los tallos; este efecto ha podido influir sobre todo en las plantas erectas o semi-erectas. Por la misma razón, las plantas fueron más erectas en 2009 que en 2008.

En C13 (tercer corte de 2008), las plantas presentaron un porte medio más rastrero que en C12 o en C14, probablemente debido al efecto de la tormenta con granizo acaecida en este periodo (segunda quincena de junio).

Las plantas que tuvieron el porte más rastrero (‘Korunga’ y ‘Polonia’) estuvieron entre las más productivas, junto con las que tuvieron el porte más erecto (‘Visnovsky’ y ‘Reznos’), lo que puede indicar distintas tendencias en la selección en función del destino del cultivo, selección que los agricultores han podido ejercer dependiendo del uso al que se destina la esparceta. En un cultivo destinado a la producción de heno, un porte más erecto puede resultar más adecuado; un porte rastrero incrementa la cobertura y la protección del suelo, especialmente cuando la esparceta se cultiva con fines medioambientales o para pastoreo.

#### **IV.1.3 Fecha de corte**

La fecha de inicio del primer corte se retrasó 20 días entre 2008 y 2009. Sin embargo, el orden de floración de las variedades se mantuvo en los dos años, lo que indica que se trata de un carácter varietal. La precocidad estuvo correlacionada con una menor producción, las plantas más precoces fueron las menos productivas.

No se encontró relación significativa entre la intensidad de floración y la precocidad, al contrario de los resultados de Badoux (1965) o Michelena (1983), según los cuales las esparcetas del tipo de un corte fueron 5 y 2 días más precoces que las de dos cortes. Por el contrario, se apreció una elevada relación entre la precocidad y el origen (nacional o foráneo) de las variedades, siendo las variedades locales notablemente más precoces (4 vs 11 días), lo que denota una mayor adaptación a las condiciones mediterráneas y una salida precoz del invierno. A pesar de que la fecha del primer corte se retrasó por culpa de las malas condiciones ambientales en 2009, la duración del periodo entre los cortes de verano no estuvo correlacionada con las temperaturas.

#### IV.1.4 Enfermedades y plagas

**Oídio:** El nivel máximo de contaminación por el oídio se produjo durante los tres años de cultivo, en el periodo comprendido entre el tercer y el cuarto corte, el cual abarca desde la mitad de julio a la mitad de septiembre. La combinación de la mayor duración del periodo entre cortes, del calor estival y de la humedad, en este caso aportada por el riego, fomentaron las condiciones idóneas para la proliferación del hongo. Sharifnabi y Banihashemi (1990) y Celik *et al.* (2011) encontraron el mismo pico de contaminación, en junio por *Erysiphe trifolii* y en agosto (tercer corte) por *Leveillula taurica*. En 2007, el oídio afectó mayormente a las plantas más adelantadas en su desarrollo, lo que se explica por el hecho de que las plantas en estado vegetativo siguieron produciendo hojas nuevas que tardaron en contaminarse, mientras que las plantas en estado de floración dejaron de producir hojas, para desarrollar inflorescencias. El oídio no conllevó la muerte de plantas; contrariamente, el nivel de contaminación por oídio fue significativa y negativamente correlacionado con la mortalidad en 2007. Esta paradoja se debe a que la plantas que presentaron la mayor contaminación de oídio tuvieron también mayor intensidad de floración y este último criterio estuvo vinculado con una menor mortalidad en 2007 ( $P < 0,001$ ,  $r = 0,54$ ). Sharifnabi y Banihashemi (1990) mencionaron un decrecimiento del contenido en nitrógeno en las plantas afectadas que no fue perceptible en nuestras condiciones ya que se confunde con el efecto del factor ‘corte’.

**Plagas y virus:** La baja incidencia de insectos y moluscos observada en la esparceta y la ausencia de virus se pueden explicar, por una parte, por la disposición misma del ensayo (cultivo alejado, en espacio y tiempo, de otros cultivos de esparcetas; cultivo en plantas distanciadas) lo cual pudo contribuir a minimizar la posibilidad de proliferación de plagas. Por otra parte, la esparceta puede estar protegida por su contenido en taninos y polifenoles, los cuales son bien conocidos como parte del sistema de defensa de las plantas frente a insectos y moluscos, pero también frente a hongos y bacterias (Bernays y Chapman 1994; Haring *et al.* 2008). Además de los taninos y polifenoles, dos 2-arylbenzofuranos, el sainfurano y el metilsainfurano, encontrados en raíces de esparceta, mostraron un efecto repelente sobre el coleóptero *Costelyra zeolandica* y antifúngico sobre *Cladosporium cladosporoides* (Russell *et al.* 1984). Todo ello ha podido contribuir a que, a pesar de la riqueza en especies de artrópodos y moluscos encontrados en la esparceta, hubiese escasos daños tanto en el forraje como en las semillas. Hewitt y Burleson (1976) llegaron a las mismas conclusiones en esparceta cultivada en Montana (E.E.U.U.).

#### IV.1.5 Mortalidad

La mortalidad no se vio afectada por el factor ‘variedad’, ni siquiera en las variedades que presentaron los caracteres más definidos de plantas de un corte o de dos cortes, cuando las primeras se consideran más persistentes que las segundas (Badoux 1965; Michelana y Hycka 1988).

La mortalidad puede ser atribuida a la disminución de las reservas de las plantas debido a un ritmo de corte intensivo, como sugieren Mowrey y Matches (1991), en cuyo caso la mortalidad debería ir creciendo corte tras corte, siendo mayor en el quinto corte. Sin embargo, en nuestro ensayo, la mortalidad fue máxima en C3 y C4 (y C2 en 2009), siendo muy baja en C5 (tanto en 2008 como en 2009). Este reparto de la mortalidad coincide con el periodo de temperaturas medias máximas, lo que nos lleva a pensar que la disminución de las reservas ha podido influir sobre la mortalidad pero que la causa decisiva de la mortalidad de la esparceta fue un excesivo calor.

Mowrey y Volesky (1993) ya mencionaron mortalidad de la esparceta en respuesta a temperaturas altas en verano, sin implicación aparente de enfermedades. Kallenbach *et al.* (1996), en un ensayo en cámaras con temperatura controlada, pusieron en evidencia el aumento de la actividad metabólica de la esparceta cuando la temperatura aumenta, así como una reducción de los carbohidratos de reserva, llegando al resultado de que tan sólo el 7% de las plantas resistió una temperatura del aire de 35 °C. En plantas cuya actividad fotosintética es del tipo C<sub>3</sub>, el rango de temperaturas óptimas se sitúa en general entre 10 °C y 20 °C y se observan reducciones importantes en crecimiento y fotosíntesis neta cuando la temperatura sobrepasa los 30 °C, debido al hecho de que la respiración aumenta mucho más rápidamente que la fotosíntesis por encima de 20 °C (Campbell *et al.* 1994). El desequilibrio entre los dos fenómenos puede ocasionar el cese del crecimiento y, por último, en caso de un estrés prolongado, la muerte de la planta.

Esta característica de la esparceta explicaría por qué de manera empírica se considera que, en la cuenca mediterránea, este cultivo es adecuado para zonas a partir de 600 m de altitud, donde las temperaturas son más templadas que en el valle y permiten una mejor persistencia de la esparceta (Buendía-Lázaro y García-Salmerón 1965; Caballero 1972).

No se descarta que parte de la mortalidad observada pueda ser debida a la podredumbre de la corona y raíz por patógenos del tipo *Pythium*, *Verticillium*, *Fusarium* o *Phytophthora*, que están presentes en el valle medio del Ebro (C. Chocarro, Informe final Proyecto RTA2005-00105-C02-02), y que han podido ser letales sobre plantas ya debilitadas por el calor.

#### IV.1.6 Producción de materia seca

Para determinar la frecuencia de corte de un cultivo de esparceta en condiciones de regadío, el criterio “corte en plena floración” se impuso como el criterio que mejor representa el estado fisiológico de la planta (Delgado *et al.* 2008a), frente al criterio de altura de la planta (Borreani *et al.* 2003) que no aporta ninguna indicación sobre su estado de fenológico (una planta de 30 cm de altura puede estar tanto en estado vegetativo como en final de floración, dependiendo de variedades y época del año).

En condiciones de secano, el manejo habitual de la esparceta consiste en un corte en primavera que aporta el 75% de la producción anual, un probable corte estival del rebrote y/o un aprovechamiento en estado vegetativo a lo largo del invierno por el ganado (Delgado *et al.* 2002). Al ser cultivada en regadío, el número de aprovechamientos aumentó hasta llegar a los cinco cortes en este ensayo. Sin embargo, el reparto fue similar con preponderancia del primer corte, incluso si al ser los cortes más numerosos tuvieron un peso relativo menor. Similares conclusiones fueron obtenidas por Borreani *et al.* (2003) y Delgado *et al.* (2008a).

La producción de MS en 2009 fue menor que en 2008 lo que pudo deberse al agotamiento de las plantas tras un año de producción o al acortamiento de los periodos entre los primeros cortes de 2009 (C1 a C2 y C2 a C3).

Algunas variedades como ‘Korunga’, ‘Yubineyna’, ‘Polonia’, ‘Reznos’ y ‘Visnovsky’ destacaron por la alta proporción de los cortes C1 y C2 sobre la producción anual total, y fueron también las variedades que tuvieron la mayor producción total. Ello fue debido a que la producción en los cortes C3, C4 y C5 fue baja y similar para todas las variedades, por lo que las variaciones en la producción total se encontraron necesariamente ligadas a la alcanzada en los cortes C1 o C2.

La producción de MS estuvo positivamente correlacionada con la intensidad de floración, lo que corrobora los trabajos de Delgado *et al.* (2008b) y Prosperi *et al.* (1994) pero no coincide con los resultados de Badoux (1965) y Michelena (1983). Estos dos últimos autores no encontraron diferencias entre los tipos de uno y dos cortes o la producción fue levemente superior en las esparcetas de un corte (Badoux 1965). Más concretamente, hubo una correlación significativa entre la producción de MS y la intensidad de floración en los tres primeros cortes, siendo máxima en el segundo corte ( $r= 0,49$  en 2008,  $r= 0,41$  en 2009); sin embargo, la correlación no fue significativa en C4 y C5. Esta correlación entre intensidad de floración y producción de MS en los primeros cortes, puso en evidencia que la intensidad de floración va unida a una mayor capacidad o velocidad de rebrote. Así, esta afectó al C1 y sobre todo al C2, pero no afectó al C4 y al C5 donde se alargó el periodo entre cortes lo que permitió que se desarrollasen del todo incluso las variedades de rebrote más lento, por lo que la intensidad de floración tuvo un efecto visible sobre la producción total.

#### IV.1.7 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales asociado a la formación de un dendograma UPGMA permitió distinguir 5 grupos de variedades claramente caracterizadas por su comportamiento agronómico (**Figura 5.1.7** y **Tabla 5.1.7**).

En el grupo A se situó una sola variedad, ‘Costwold common’ que se distingue en muchos aspectos del resto de las variedades. Esta variedad presentó la menor intensidad de floración junto con ‘Graus’, y también una producción de MS y un porte de los más rastreros. La casa de semillas que la seleccionó, *Costwold Seeds*, lo hizo sobre la base de una elevada persistencia (Robin Hill, comunicación personal), lo cual no llegó a manifestarse en este ensayo, probablemente debido a una mala adaptación a las condiciones ambientales de la zona.

Los grupos B y D, que agrupan 14 de las 23 variedades, presentaron valores medios en intensidad de floración y producción de MS y la mortalidad fue alta. Los dos grupos divergieron únicamente por el porte, semi-erecto (grupo B) o erecto (grupo D).

Los grupos C y E reúnen a las variedades que destacaron por su elevado nivel de producción, siendo superiores las variedades del grupo E, las cuales asocian el nivel de producción más alto con la mortalidad más baja.

Es interesante señalar la presencia de variedades locales y foráneas mezcladas en los grupos B, C y D, lo que indica que la posible mayor adaptación al medio de las variedades locales no constituyó una ventaja en las condiciones del cultivo; por otra parte, corrobora lo que se deducía de las encuestas a agricultores (Delgado *et al.* 2002), que el uso de variedades foráneas no se realiza con fin de introducir un material mejorado sino con una justificación puramente económica de precio y de disponibilidad de semillas.

Las tres variedades foráneas, ‘Yubileyna’, ‘Polonia’ y ‘Korunga’, presentaron unas excelentes características agronómicas que deberán ser comprobadas en futuros ensayos.

## IV.2 Composición química de la MS

La composición química de las variedades estuvo influenciada principalmente por el factor 'corte'. Los dos primeros cortes divergieron tanto por el nivel de producción de MS como por su contenido en fibra, teniendo el segundo corte una menor producción y un contenido más elevado en FND, FAD y LAD.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido en PB. Los valores de FND y PB descritos en nuestro ensayo, coinciden con los obtenidos por Borreani *et al.* (2003) en un ensayo en el que las plantas se segaron en un estado entre plena y final de floración (según su escala denominado 'late flowering') y con los obtenidos por Delgado *et al.* (2010) con plantas en plena floración.

El tercer corte presentó un contenido en PB significativamente más alto que los dos primeros cortes, 19,4% vs 16,5% y 18,1% respectivamente, asociado a unos niveles de FND y FAD más bajos. El intervalo más corto habido entre el segundo y el tercer corte, 30 días, que entre el primer y el segundo corte, 41,5 días (debido a temperaturas medias más altas), pudo influir para que las plantas, a pesar de presentar el mismo estado fenológico, llegaran más jóvenes, en número de días, a la fecha de corte y, por tanto, con mayor contenido en PB y menor en fibra.

El cuarto corte presentó un contenido en PB similar al primer corte (16,8%), asociado con un contenido significativamente más alto ( $P < 0,001$ ) en LAD, 10,1% vs 7,8% en el primer corte. En este corte, la temperatura media fue de 22,8 °C y las plantas pararon su crecimiento; en promedio, tardaron 69 días para llegar al estado idóneo de plena floración, momento en que las hojas empezaron a presentar señales de senescencia.

En otoño, el rebrote no floreció por lo que el quinto corte mostró plantas muy frondosas sin apenas tallos y, por ello, el contenido en PB fue más elevado, 24,2%, con unos contenidos en FND y FAD bajos, 34,7 % y 20,5% respectivamente. No hubo reducción de la calidad del forraje en el intervalo entre el cuarto y quinto corte, que fue de 61 días, debido probablemente a las bajas temperaturas habidas en la segunda mitad de este intervalo (meses de octubre y noviembre). Estos valores de composición química, para los rebrotes de otoño, son coincidentes con plantas en estado vegetativo (Borreani *et al.* 2003; Whitehead y Jones 1969).

El contenido en cenizas aumentó de C1 a C5 a medida que se redujo la producción, siendo de 7,8%, 8,7%, 9,7% y 11,3% a 11,3%. Ello podría ser atribuido al hecho de que cuanto más pequeñas fueron las plantas mayor peso representó la contaminación por tierra en hojas y tallos, inevitable a pesar del lavado de las mismas.

La composición química de los distintos cortes fue relativamente estable en los dos años; el factor 'año' afectó significativamente a la composición química pero con una variación explicada que no sobrepasó el 5%. Las diferencias obtenidas podrían explicarse principalmente por una menor producción de MS de las plantas en 2009 y la variación en las fechas de corte. Los intervalos entre los cortes más productivos, C1-C2 y C2-C3, fueron más cortos en 2009 lo que no permitió mantener el nivel de producción de 2008. Por otra parte, las fechas de corte de 2009 fueron más tardías y las temperaturas entre los cortes más elevadas, dando lugar a plantas con menor contenido en PB y más paredes celulares.

El peso discriminatorio de la composición química, determinado con los análisis de componentes principales, fue considerablemente menor que el de las características agronómicas. Si nos focalizamos sobre el determinante de la calidad de un forraje, el contenido en PB, y consideramos la producción de proteína total producida por variedad, la variación observada se atribuiría en un 75% a la producción de MS y tan sólo un 0,12% a la variación del contenido en PB, lo que conlleva que el contenido menor en PB de las variedades más productivas haya sido enmascarado con creces por el aumento de producción.

El contenido en TC constituye un criterio importante en la esparceta y existe una variación importante entre variedades de 1,6% a 2,3% para 'Fakir' y 'Cotswold common'. Hay que resaltar que las tres variedades que destacaron a nivel agronómico, 'Korunga', 'Polonia' y 'Yubileyna', se sitúan en el primer tercio de las variedades con mayor contenido en TC.

## V. CONCLUSIONES

El seguimiento de las características agronómicas y de la composición química de una colección de variedades de esparceta mostró una amplia diversidad entre las mismas:

Las variedades presentaron un amplio rango de variación en lo que respecta a intensidad de floración, producción de forraje, porte y mortalidad, siendo el primer criterio el preponderante. El análisis de componentes principales, realizado sobre la base a dichos parámetros, permitió distribuir las variedades en cinco grupos de comportamiento agronómico distinto.

La fecha de corte incidió de manera importante en las determinaciones agronómicas. El reparto de la producción mostró un modelo característico de la especie, con un peso preponderante del primer corte sobre la producción anual. Destacaron por su elevada producción ocho variedades: 'Fakir', 'Visnosky', 'Reznos', 'Selección 7.1', 'Villahoz', 'Yubileyna', 'Polonia' y 'Korunga', tres de las cuales, 'Korunga', 'Polonia' y 'Yubileyna', tuvieron también las mortalidades más bajas.

Los niveles de PB, FND, FAD y ADL se consideraron satisfactorios en las condiciones del ensayo, siendo de media 19%, 40%, 28% y 8%, respectivamente. Los niveles de TC fueron moderados, entre 0,8 % y 3,5 %, y de media, 1,9 %.

Las variedades que tuvieron mayor intensidad de floración fueron las más productivas, con tendencia a un porte más erecto, menor contenido en PB y TC y mayor contenido en FND y FAD.

La incidencia de plagas y enfermedades fue inapreciable. Únicamente se detectó la presencia de oídio (*Erysiphe* sp.) al final del verano, afectando indiscriminadamente a todas las variedades.

La mortalidad presentó una tasa del 50 % al 78 %; tuvo lugar principalmente en los cortes de verano, lo que se atribuyó a las elevadas temperaturas habidas durante el mismo.

Las variedades autóctonas no tuvieron, en general, un comportamiento distinto de las variedades foráneas, salvo en el criterio precocidad que se puede interpretar como una adaptación a las condiciones del medio.

Haciendo omisión de la tasa de mortalidad, la colección estudiada presentó un comportamiento global satisfactorio en unas condiciones que fueron voluntariamente difíciles (localización del estudio, sistema de riego, ritmo de corte).

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badoux S (1965). Etudes des caractères morphologiques, physiologiques et agronomiques de populations d'esparcette (*Onobrychis* sp). La recherche en Suisse 4: 111-190.
- Bernays EA, Chapman RF (1994). Host-plant selection by phytophagous insects. Ed: Chapman & Hall, New York, USA. 312 pp.
- Borreani G, Peiretti PG, Tabacco E (2003). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) in the spring growth cycle. Agronomie 23: 193–201.
- Buendía Lázaro F, García Salmerón S (1965). Estudio botánico, ecológico y pascícola de las principales especies espontáneas de los pastizales de montaña de nuestras regiones semiáridas. Monografía del género *Onobrychis*. Ed: Ministerio de Agricultura, Madrid. 51 pp.
- Caballero G (1972). Ecology, agronomic and nutritive value of species and varieties of forage interest for Spain. Pastos. 183-198 pp.
- Campbell N, Mitchell L, Reece J (1994). Biology: Concepts and Connections. Ed: Benjamin Cummings, Redwood City, USA
- Çelik A, Karakaya A, Avci S, Sancak C, Özcan S (2011). Powdery mildews observed on *Onobrychis* spp. in Turkey. Australasian Plant Disease Notes: 1-5.
- Delgado I, Andres C, Sin E, Ochoa MJ (2002). Estado actual del cultivo de la esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Encuesta realizada a agricultores productores de semilla. Pastos 32: 235-247.
- Delgado I, Andrés C, Muñoz F (2008a). Effect of the environmental conditions on different morphological and agronomical characteristics of sainfoin. Cahiers Options Méditerranéennes 79: 199-202.
- Delgado I, Salvia J, Buil I, Andrés C (2008b). The agronomic variability of a collection of sainfoin accessions. Spanish Journal of Agricultural Research 6: 401-407.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoun S (2010). Caracterización y valor nutritivo de diferentes estados fenológicos de la esparceta. En: IV Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes, Zamora - Miranda do Douro. 247-252.
- Goering HK, Van Soest PJ (1970). Forage fiber analysis. En: USDA-ARS Agriculture Handbook n° 379. Ed. United States Government Printing Office, Washington, DC, USA. 20 pp.
- Haring DA, Huber MJ, Suter D, Edwards PJ, Luescher A (2008). Plant enemy-derived elicitors increase the foliar tannin concentration of *Onobrychis viciifolia* without a trade-off to growth. Annals of Botany, UK 102: 979-987.
- Helrick K (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Arlington. 703 pp.
- Hewitt GB, Burleson WH (1976). A preliminary survey of the arthropod fauna of sainfoin in central Montana. Ed: Montana Agriculture Experimental Station Bulletin, 11 pp.
- Kallenbach R, Matches A, Mahan J (1996). Sainfoin regrowth declines as metabolic rate increases with temperature. Crop Science 36: 91–97.
- Michelena A, Hycka M (1988). Diferenciación y caracterización de dos tipos de esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) cultivada en España. Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales 3: 285-290.



- Michelena A (1983). Tesis: Estudio de la variabilidad de la esparceta cultivada (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) en España. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Lérida. 198 pp.
- Minitab (2003). MINITAB Statistical Software. Ed: Minitab Inc, Pennsylvania State College, USA.
- Mowrey D, Matches A (1991). Persistence of sainfoin under different grazing regimes. *Agronomy Journal* 83: 714-716.
- Mowrey DP, Volesky JD (1993). Feasibility of grazing sainfoin on the southern great plains. *Journal of Range Management* 46: 539-542.
- Porter LJ (1989). Tannins. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Ed: Dey PM, Harborne JB. Academic Press Inc, San Diego, CA. 389 – 341 pp.
- Prosperi JM, Demarquet F, Angevain M, Mansat P (1994). Evaluation agronomique de variétés de pays de sainfoin (*Onobrychis sativa* L.) originaires du sud-est de la France. *Agronomie* 14: 285-298.
- Russell GB, Shaw GJ, Christmas PE, Yates MB, Sutherland ORW (1984). Two 2-arylbenzofurans as insect feeding deterrents from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Phytochemistry* 23: 1417-1420.
- SAS (2004). Ed: SAS OnlineDoc® 9.1.3, NC, USA.
- Sharifnabi B, Banihashemi Z (1990). Study of the *Leveillula taurica*, the incitant of sainfoin powdery mildew in Esfahan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 26: 7-9.
- Shenk JS, Westerhaus MO (1991). Population definition, sample selection and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 31: 469-474.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Whitehead D, Jones E (1969). Nutrient elements in the herbage of white clover, red clover, lucerne and sainfoin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 20: 584-591.
- Williams PC, Sobering DC (1996). How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibration. En: *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Ed: Davies MC, Williams P. NIR Publications, Chichester, UK. 185-188 pp.

ANEXO I

**Tabla 1.** Intensidad de floración (IF, en % de plantas florecidas) e incidencia del oídio (IO, escala de 0 a 5) en una colección de esparcetas en 2007 (DE, desviación estándar).

Variedad	IF		IO	
	Media	DE	Media	DE
Cotswold C.	14,2	12,3	3,083	0,072
Somborne	86,1	7,3	3,694	0,428
Esparcette	90,2	1,3	4,03	0,319
Sepial	91,9	3,1	3,75	0,661
Ambra	85,5	3,4	3,752	0,728
Fakir	83,3	5,0	3,472	0,173
Ucrania	81,5	3,5	3,75	0,382
Incoronata	88,8	4,7	3,907	0,395
Visnovsky	84,6	20,4	4,381	0,365
Yubileyna	83,8	2,3	3,78	0,417
Korunga	70,1	25,8	3,641	0,4
Polonia	74,2	22,4	3,836	0,306
Selección 9.2	66,5	12,2	3,25	1,377
Reznos	91,4	1,8	4,078	0,701
Selección 7.1	84,0	6,0	3,681	0,306
Mezquita de J.	63,3	6,7	3,374	0,181
Lagueruela	81,9	4,0	3,609	0,451
Loarre	84,8	2,8	4,311	0,312
Villahoz	87,4	6,2	3,917	0,144
Torrecilla de C.	88,4	2,9	3,806	0,679
Graus	24,8	8,6	3,454	0,405
Tartareu	38,1	25,5	3,228	0,553
Villahermosa del R.	66,6	10,0	3,684	0,199

**Tabla 2** Porte, expresado como el ratio altura/diámetro, en cada corte de una colección de esparcetas en 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C,	1,06	0,21	1,18	0,07	0,87	0,20	1,39	0,10	1,12	0,10	1,06	0,21	1,18	0,07	1,51	0,11	1,21	0,12	1,12	0,10
Somborne	1,17	0,19	1,34	0,11	1,35	0,08	1,46	0,12	1,59	0,07	1,17	0,19	1,34	0,11	1,53	0,33	1,37	0,78	1,59	0,07
Esparcette	1,02	0,25	1,42	0,15	1,42	0,06	1,89	0,05	1,90	0,14	1,02	0,25	1,42	0,15	1,82	0,23	1,89	0,49	1,90	0,14
Sepial	1,05	0,09	1,44	0,10	1,28	0,01	1,38	0,13	1,63	0,19	1,05	0,09	1,44	0,10	1,67	0,05	1,75	0,05	1,63	0,19
Ambra	1,07	0,15	1,37	0,01	1,37	0,20	1,74	0,06	1,97	0,13	1,07	0,15	1,37	0,01	1,52	0,04	1,60	0,13	1,97	0,13
Fakir	1,31	0,39	1,46	0,22	1,48	0,04	1,50	0,05	1,62	0,12	1,31	0,39	1,46	0,22	1,56	0,19	1,61	0,93	1,62	0,12
Ucrania	1,08	0,17	1,26	0,03	1,68	0,08	1,66	0,03	1,56	0,10	1,08	0,17	1,26	0,03	1,77	0,20	1,86	0,20	1,56	0,10
Incoronata	1,14	0,23	1,41	0,05	1,25	0,07	1,69	0,10	1,76	0,11	1,14	0,23	1,41	0,05	1,53	0,18	1,92	0,29	1,76	0,11
Visnovsky	1,36	0,07	1,31	0,09	1,34	0,24	1,76	0,12	1,70	0,13	1,36	0,07	1,31	0,09	1,47	0,23	1,67	0,17	1,70	0,13
Yubileyna	1,02	0,07	1,32	0,04	1,65	0,08	1,82	0,01	1,52	0,14	1,02	0,07	1,32	0,04	1,76	0,32	1,57	0,18	1,52	0,14
Korunga	0,83	0,15	1,13	0,07	1,02	0,27	1,50	0,44	1,20	0,09	0,83	0,15	1,13	0,07	1,52	0,20	1,34	0,44	1,20	0,09
Polonia	0,89	0,16	1,19	0,12	1,42	0,09	1,41	0,11	1,54	0,02	0,89	0,16	1,19	0,12	1,92	0,43	1,38	0,11	1,54	0,02
Selección 9,2	1,19	0,14	1,24	0,05	1,04	0,03	1,44	0,06	1,70	0,12	1,19	0,14	1,24	0,05	1,48	0,20	1,59	0,24	1,70	0,12
Reznos	1,36	0,13	1,45	0,07	1,12	0,16	1,50	0,23	1,66	0,07	1,36	0,13	1,45	0,07	1,47	0,17	1,82	0,24	1,66	0,07
Selección 7,1	1,35	0,11	1,43	0,06	1,43	0,14	1,50	0,16	1,71	0,13	1,35	0,11	1,43	0,06	1,34	0,14	1,76	0,21	1,71	0,13
Mezquita de J,	1,21	0,08	1,23	0,04	0,93	0,06	1,21	0,17	1,48	0,18	1,21	0,08	1,23	0,04	1,37	0,06	1,90	0,32	1,48	0,18
Lagueruela	1,21	0,24	1,31	0,18	0,96	0,10	1,24	0,23	1,48	0,11	1,21	0,24	1,31	0,18	1,40	0,03	1,54	0,17	1,48	0,11
Loarre	1,32	0,05	1,41	0,01	1,04	0,14	1,47	0,21	1,72	0,16	1,32	0,05	1,41	0,01	1,71	0,18	1,61	0,35	1,72	0,16
Villahoz	1,27	0,11	1,35	0,09	1,08	0,04	1,48	0,08	1,77	0,07	1,27	0,11	1,35	0,09	1,42	0,27	1,88	0,27	1,77	0,07
Torrecilla de C,	0,99	0,07	1,40	0,05	1,38	0,06	1,30	0,04	1,64	0,16	0,99	0,07	1,40	0,05	1,73	0,05	1,76	0,17	1,64	0,16
Graus	1,17	0,16	1,31	0,08	1,01	0,10	1,34	0,13	1,44	0,18	1,17	0,16	1,31	0,08	1,58	0,11	1,64	0,17	1,44	0,18
Tartareu	1,06	0,20	1,38	0,12	1,11	0,07	1,24	0,02	1,48	0,20	1,06	0,20	1,38	0,12	1,68	0,25	1,71	0,13	1,48	0,20
Villahermosa del R,	0,98	0,12	1,20	0,18	1,03	0,21	1,23	0,13	1,68	0,12	0,98	0,12	1,20	0,18	1,53	0,34	1,43	0,35	1,68	0,12

DE = desviación estándar

**Tabla 3** Producción media de materia seca (g) por planta y corte de una colección de esparcetas en 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		2008	C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5		2009
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Cotswold C.	223	5	157	7	62	4	60	18	50	23	552	249	53	60	11	71	21	71	69	43	7	494
Somborne	263	36	163	14	91	9	67	12	50	8	634	229	28	109	15	83	27	73	5	37	6	531
Esparcette	386	101	235	49	63	11	74	16	23	5	781	226	39	75	24	60	11	70	12	33	6	464
Sepial	315	15	263	21	129	15	91	22	50	18	848	261	58	146	31	76	6	96	27	31	11	610
Ambra	371	30	255	11	71	19	50	14	22	4	769	304	50	101	42	44	14	72	19	26	12	547
Fakir	374	33	291	42	123	49	86	17	41	11	915	306	56	110	36	63	8	97	18	30	4	606
Ucrania	393	43	273	38	81	62	75	9	43	12	865	314	53	89	5	70	18	40	19	13	3	526
Incoronata	340	12	296	17	133	31	66	29	55	32	890	373	120	111	70	70	32	76	30	37	18	667
Visnovsky	387	33	321	30	156	26	83	28	41	15	988	336	103	162	49	83	51	102	25	29	5	712
Yubileyna	453	44	262	24	83	11	71	13	39	6	908	389	58	154	24	24	12	89	39	37	15	693
Korunga	493	103	286	9	58	11	59	4	25	9	921	201	11	134	8	25	8	94	31	32	10	486
Polonia	569	18	280	2	90	15	88	6	42	7	1069	385	81	151	26	22	3	113	36	35	7	706
Selección 9.2	298	57	258	62	79	12	60	8	51	2	746	280	38	112	7	47	11	81	45	49	32	569
Reznos	370	13	324	26	105	16	93	24	51	8	943	341	17	123	18	97	32	130	57	49	17	740
Selección 7.1	400	50	289	48	89	13	83	10	59	8	920	373	33	100	38	66	12	63	35	24	10	626
Mezquita de J.	325	19	210	15	74	16	38	14	29	6	676	162	18	77	11	43	8	59	12	27	3	368
Lagueruela	348	102	256	21	129	22	83	5	48	9	864	284	19	102	14	68	8	59	5	23	3	536
Loarre	361	57	166	30	90	18	59	30	48	7	724	280	51	121	22	71	7	76	29	40	21	588
Villahoz	417	94	265	65	90	22	75	29	43	9	890	241	22	88	23	77	57	64	27	25	5	495
Torrecilla de C.	338	70	357	51	118	16	42	8	51	3	906	275	17	125	39	86	4	74	10	29	1	589
Graus	310	61	181	33	50	10	68	27	42	11	651	220	19	50	17	33	21	84	0	28	5	415
Tartareu	347	21	226	39	86	19	76	24	53	16	788	324	39	97	36	57	19	60	32	32	7	570
Villahermosa del R.	283	35	156	25	117	92	64	15	52	12	672	383	48	97	3	60	10	52	22	33	3	625

DE = desviación estándar

**Tabla 4** Mortalidad acumulada en cada corte (% de plantas muertas), de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Variedad ↓/Corte →	C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	C1.5	C2.1	C2.2	C2.3	C2.4	C2.5
Cotswold C.	27,7	27,8	32,8	38,9	38,9	41,7	47,2	69,4	69,4	69,4
Somborne	0,0	0,0	5,6	44,4	44,7	50,0	66,7	77,8	77,8	77,8
Esparcette	2,8	5,6	13,9	27,9	30,6	38,9	47,2	58,3	66,7	72,9
Sepial	5,6	11,1	13,9	27,9	36,0	36,1	38,9	39,0	52,8	52,8
Ambra	11,1	11,1	16,8	33,2	41,7	47,2	55,6	55,7	77,8	77,8
Fakir	2,8	2,8	8,2	11,1	16,7	16,7	61,1	61,2	69,6	72,1
Ucrania	8,3	8,3	19,4	25,0	36,2	41,7	52,8	61,1	75,1	80,6
Incoronata	11,0	11,1	27,8	47,2	52,8	55,7	61,1	63,9	75,0	77,8
Visnovsky	13,9	13,9	13,9	19,4	22,2	22,2	33,3	36,0	55,6	58,3
Yubileyna	5,6	5,6	11,1	19,4	22,1	24,9	33,3	38,9	41,7	50,0
Korunga	2,8	2,8	5,6	11,1	22,1	22,3	30,6	47,1	50,2	55,6
Polonia	11,1	11,0	14,0	27,8	33,3	33,3	36,1	41,7	47,2	50,0
Selección 9.2	5,6	8,3	24,9	27,9	33,3	33,3	47,3	50,0	72,2	72,2
Reznos	2,8	2,8	2,8	27,7	30,6	33,3	44,4	61,1	72,1	75,1
Selección 7.1	5,6	5,6	11,1	27,8	30,6	30,6	30,6	47,2	61,1	61,0
Mezquita de J.	5,6	5,6	19,4	36,1	38,9	38,9	50,0	49,9	55,6	61,0
Lagueruela	5,4	5,6	11,1	36,0	27,8	30,6	41,7	50,0	61,1	64,0
Loarre	2,8	5,4	8,3	33,3	33,3	33,3	38,9	41,8	58,3	66,7
Villahoz	2,8	2,8	14,0	47,2	50,1	55,6	55,6	61,1	75,0	74,9
Torrecilla de C.	0,0	0,0	0,0	16,7	19,4	19,4	44,4	55,6	61,1	63,9
Graus	13,9	19,4	36,1	47,3	47,2	50,0	52,8	66,7	75,0	77,8
Tartareu	5,6	5,6	16,7	36,1	36,0	38,8	47,2	52,8	58,3	61,1
Villahermosa del R.	13,9	13,8	44,4	52,8	52,9	52,8	55,6	61,0	72,2	74,9

**Tabla 5** Valor medio y desviación estándar del contenido en cenizas (%) de la materia seca, en cada corte, de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C.	11,2	0,4	9,8	0,3	10,5	0,1	11,5	0,1	12,0	1,9	6,7	0,6	8,8	0,3	12,3	2,2	11,3	0,6	11,4	0,3
Somborne	10,2	0,3	9,3	0,2	9,6	1,2	11,7	0,3	11,1	1,8	6,4	0,3	9,2	0,9	10,6	0,4	12,3	0,8	10,2	1,7
Esparcette	8,5	0,1	8,3	0,0	8,8	0,7	10,6	0,2	11,8	2,7	6,0	1,2	7,8	0,9	10,6	1,3	11,6	0,1	11,2	1,0
Sepial	8,9	0,6	9,2	0,7	9,9	0,8	11,0	0,5	12,0	1,0	6,8	0,4	8,0	0,4	8,8	0,6	9,5	0,4	11,1	,
Ambra	9,2	0,2	7,7	0,4	9,8	0,4	10,5	0,7	10,9	0,8	6,5	0,8	8,2	0,4	8,7	0,6	11,4	1,6	11,4	0,6
Fakir	9,6	0,4	8,8	1,0	8,6	0,6	12,1	0,9	11,3	1,1	6,0	0,8	8,4	0,3	9,6	1,1	11,3	1,6	11,9	0,0
Ucrania	9,4	1,4	8,5	0,8	8,5	0,8	10,3	0,1	11,5	0,7	5,2	0,6	7,8	1,2	10,4	2,0	11,7	1,0	10,7	0,1
Incoronata	9,3	0,3	9,2	1,0	9,4	0,3	11,7	0,2	11,4	0,7	7,3	0,6	9,1	0,7	8,6	2,1	11,5	0,5	11,6	1,0
Visnovsky	6,9	0,6	9,5	0,4	8,5	0,6	11,4	1,3	11,8	0,7	7,2	0,9	8,5	0,7	9,4	1,3	10,5	0,7	12,2	0,4
Yubileyna	9,8	0,7	8,8	0,2	8,5	0,7	11,3	0,9	11,6	1,4	6,8	1,2	8,1	0,4	10,6	1,1	11,2	1,1	12,1	0,6
Korunga	8,9	0,4	8,2	0,3	10,5	0,4	11,6	1,0	12,1	0,4	6,9	0,6	7,4	0,5	10,7	0,7	11,3	2,1	10,9	0,2
Polonia	9,3	0,6	8,3	0,6	9,4	1,0	11,9	0,7	11,9	1,2	6,8	0,8	7,5	0,9	10,9	0,3	10,0	0,4	12,0	0,9
Selección 9.2	8,1	0,8	9,4	1,2	9,0	0,9	11,4	1,4	11,9	0,4	5,9	0,5	7,9	1,1	9,4	0,7	10,4	0,8	11,2	1,4
Reznos	9,5	0,3	9,1	0,3	11,2	0,3	12,3	0,8	11,8	0,4	5,8	0,8	9,0	0,9	10,2	0,6	10,5	1,7	11,2	0,4
Selección 7.1	9,3	0,8	9,4	0,7	9,2	0,7	11,0	0,6	11,1	0,3	6,8	0,3	8,3	1,1	10,0	0,5	11,1	0,7	10,0	0,4
Mezquita de J.	9,6	1,1	9,7	0,7	9,0	0,2	11,8	1,3	9,9	0,5	6,5	0,4	8,9	0,8	11,0	0,8	11,0	0,3	11,0	0,2
Lagueruela	9,0	1,6	9,7	1,6	7,8	0,2	11,9	1,5	11,3	0,7	6,5	0,3	8,5	0,5	9,1	0,9	10,8	0,1	10,5	0,8
Loarre	9,6	1,4	8,5	0,3	9,5	0,4	11,9	,	11,9	1,4	5,9	0,2	8,4	0,4	9,6	0,8	11,7	0,0	11,0	1,3
Villahoz	8,6	0,2	8,7	0,4	9,9	0,7	11,5	0,3	10,6	0,7	6,2	0,2	8,2	0,5	8,9	0,1	11,3	1,5	11,1	0,1
Torrecilla de C.	9,2	0,3	8,8	0,6	9,9	1,0	11,6	1,6	12,2	2,0	5,3	0,5	8,2	1,2	10,2	0,6	10,9	1,1	11,3	1,0
Graus	9,4	0,8	9,8	0,5	8,7	0,4	10,9	1,9	11,2	1,7	5,9	0,2	8,5	0,5	10,3	1,1	9,7	1,5	10,6	0,6
Tartareu	10,3	,	9,8	1,4	9,2	0,5	11,8	0,5	11,2	0,3	6,1	0,8	9,2	0,6	11,5	1,9	12,2	0,3	10,7	1,1
Villahermosa del R.	9,6	0,2	9,9	0,4	8,5	0,8	10,7	0,8	10,8	,	6,8	0,8	8,8	0,2	10,7	3,1	11,2	0,4	11,4	1,4

**Tabla 6** Valor medio y desviación estándar del contenido en fibra neutro detergente (%) de la materia seca, en cada corte, de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C.	38,9	0,7	44,3	2,3	41,0	5,2	29,0	,	44,3	2,3	44,7	1,5	34,0	2,5	37,9	7,9	41,7	0,1	23,9	3,7
Somborne	38,5	0,2	44,7	4,7	39,6	5,4	29,1	1,6	45,8	4,1	40,2	6,3	33,9	4,1	37,4	4,8	49,6	3,5	23,5	5,3
Esparcette	47,3	3,8	46,3	2,1	42,1	3,7	29,0	0,7	45,3	1,1	51,6	2,3	31,6	0,3	35,3	4,1	42,2	12,1	27,3	14,2
Sepial	43,4	0,6	46,0	2,1	39,2	6,1	28,6	,	45,5	2,5	44,5	4,1	34,5	1,5	44,8	3,7	58,4	3,6	19,5	,
Ambra	40,5	2,1	43,1	2,3	39,1	4,4	41,6	2,1	42,2	4,1	43,5	0,3	33,1	1,9	43,5	0,9	48,1	4,6	26,0	6,7
Fakir	39,4	2,3	43,5	2,4	38,2	4,1	39,8	2,4	42,0	3,4	40,0	2,5	33,2	0,1	40,4	2,2	48,3	2,0	27,0	0,4
Ucrania	42,6	2,7	41,7	1,3	38,9	3,1	45,7	3,6	44,1	1,2	48,2	1,0	35,5	3,1	39,9	5,0	41,9	4,7	27,2	6,5
Incoronata	45,9	1,1	43,1	0,5	38,3	1,9	39,9	3,0	45,7	2,7	52,0	7,0	34,9	2,5	43,8	4,8	54,0	1,5	27,5	8,7
Visnovsky	47,2	1,8	43,5	2,2	36,9	2,2	51,6	1,6	43,8	2,5	43,3	7,1	45,3	3,5	43,6	2,9	58,4	7,1	25,6	0,4
Yubileyna	42,3	2,8	38,2	1,7	42,7	3,0	45,1	3,6	44,3	2,9	45,7	10,2	45,5	4,7	35,4	2,1	39,5	3,6	21,7	4,1
Korunga	44,1	1,0	44,5	1,6	38,6	2,5	43,2	7,7	43,2	3,5	45,6	4,5	43,5	3,2	35,5	2,2	48,7	15,8	25,8	1,0
Polonia	42,7	3,5	39,3	3,7	38,0	2,6	46,3	1,7	42,4	3,3	43,8	1,2	47,3	4,5	32,4	1,5	47,5	10,8	29,1	5,1
Selección 9.2	41,4	2,6	40,8	1,5	42,0	,	49,7	1,6	42,2	1,1	48,5	3,7	46,0	1,6	43,6	4,4	48,5	1,6	22,3	1,5
Reznos	42,8	1,0	37,8	1,8	40,7	6,1	51,0	1,6	39,0	5,8	44,6	5,0	46,9	4,2	41,1	3,7	55,1	7,4	21,5	2,9
Selección 7.1	40,2	2,2	41,8	2,8	35,5	0,5	49,7	0,9	38,2	3,9	44,5	3,4	42,1	4,4	37,6	0,5	48,6	6,1	25,2	2,7
Mezquita de J.	40,3	4,3	41,9	3,3	38,3	1,9	48,8	1,4	37,9	2,7	44,2	4,7	42,9	4,9	36,1	5,9	46,6	3,0	24,2	3,1
Lagueruela	43,0	1,4	45,7	1,4	38,7	1,8	44,2	1,1	43,9	3,1	43,4	3,9	45,1	2,1	44,9	3,8	47,5	7,2	26,8	5,5
Loarre	43,4	1,6	44,3	2,8	41,0	6,0	41,5	2,7	42,9	1,8	45,7	2,6	45,0	4,2	42,0	5,5	48,8	6,5	21,9	2,8
Villahoz	41,6	3,1	38,9	3,7	27,7	,	46,4	1,5	40,9	1,7	45,2	4,2	43,3	4,3	44,4	1,2	49,8	2,9	27,3	4,9
Torrecilla de C.	38,6	1,6	35,5	0,1	30,2	0,5	40,2	1,3	41,5	2,9	42,1	2,1	42,4	4,5	44,2	3,0	46,1	6,0	27,3	6,1
Graus	42,2	1,1	38,1	2,1	29,9	0,2	43,6	1,9	43,2	4,1	41,0	1,5	42,8	4,8	35,1	2,7	42,9	4,8	25,2	1,3
Tartareu	42,1	,	43,6	2,6	28,6	1,1	44,2	0,5	43,4	2,5	40,6	1,0	40,6	5,0	36,5	5,4	43,3	3,2	29,0	4,8
Villahermosa del R.	44,0	2,8	32,8	1,3	30,9	0,5	39,6	2,9	35,3	0,9	32,5	3,3	40,8	0,5	44,7	1,9	41,8	0,1	24,1	0,1

**Tabla 7** Valor medio y desviación estándar del contenido en fibra ácido detergente (%) de la materia seca, en cada corte, de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C.	27,8	0,7	30,0	2,3	27,6	0,9	24,7	0,6	20,1	1,3	31,4	1,5	28,9	3,3	26,5	4,7	25,5	0,0	20,5	1,5
Somborne	26,2	0,6	29,9	0,5	31,5	1,2	24,2	1,8	20,1	0,7	29,1	2,1	29,5	1,8	26,1	3,0	26,8	1,2	20,4	2,6
Esparcette	34,3	4,3	33,4	1,6	28,9	2,9	23,8	1,1	20,4	0,2	34,5	3,1	32,0	2,6	25,7	2,3	26,9	3,1	23,5	7,3
Sepial	30,9	0,0	32,3	2,2	29,4	1,1	21,5	1,3	18,6	1,4	29,2	2,3	34,5	1,6	31,5	2,5	35,4	2,7	19,1	,
Ambra	29,1	1,5	34,7	1,3	27,7	1,2	27,4	3,1	20,4	0,6	37,8	1,3	31,0	1,4	30,1	1,3	29,4	2,9	21,9	1,9
Fakir	27,7	1,8	32,7	2,2	30,4	1,8	26,5	3,7	19,0	0,5	33,5	2,7	30,2	2,1	28,1	1,6	27,9	2,4	22,8	0,7
Ucrania	31,1	1,9	33,6	2,6	30,6	3,1	25,9	3,3	18,7	1,0	31,6	6,7	32,3	1,2	28,6	2,4	25,8	1,8	21,8	1,8
Incoronata	33,2	1,2	32,3	2,8	33,1	1,0	27,4	1,9	20,5	1,2	33,4	1,5	29,3	3,0	30,4	2,7	31,2	1,1	20,6	3,3
Visnovsky	34,3	1,1	32,0	0,7	31,0	2,0	25,2	3,3	19,5	1,4	36,1	1,3	31,4	1,5	30,9	2,2	35,3	5,6	21,2	1,4
Yubileyna	30,5	2,3	32,7	0,6	28,3	2,9	25,4	2,7	19,4	0,3	36,6	0,7	31,7	2,3	24,1	1,3	24,9	0,0	20,0	1,9
Korunga	31,6	0,6	34,1	2,4	25,7	0,1	24,5	1,7	20,1	0,4	36,3	1,2	30,4	1,9	24,1	1,2	31,5	7,6	21,1	1,3
Polonia	32,1	2,0	35,4	0,5	27,5	1,3	25,0	0,4	20,9	1,2	35,5	1,6	32,2	2,7	22,4	0,4	30,7	3,3	23,7	3,2
Selección 9.2	27,3	2,7	31,5	1,9	30,8	2,2	24,2	1,6	19,9	0,7	32,6	0,9	32,5	0,8	31,0	2,8	29,1	2,1	19,9	0,9
Reznos	30,4	0,9	34,1	1,7	24,0	1,2	23,5	1,6	19,5	1,4	29,8	2,3	32,4	2,5	29,6	2,2	33,4	4,9	19,7	0,6
Selección 7.1	27,9	2,0	32,3	2,1	33,1	1,0	27,6	1,6	20,1	1,0	33,1	2,3	29,7	2,7	26,5	0,2	28,5	1,9	20,5	0,5
Mezquita de J.	28,0	3,5	32,3	3,5	30,0	0,2	23,9	1,7	20,3	1,5	29,2	1,1	30,6	2,9	26,3	3,5	29,1	2,7	21,1	1,7
Lagueruela	30,5	1,6	33,7	1,7	32,4	1,2	24,4	0,8	20,3	0,7	32,0	1,9	31,5	1,1	31,9	2,5	28,5	4,4	21,7	1,4
Loarre	30,7	1,3	33,2	1,7	33,3	1,7	26,8	,	18,6	1,3	32,7	0,1	32,2	2,5	29,3	2,9	28,2	2,2	19,6	1,3
Villahoz	29,6	3,1	30,8	1,8	32,7	0,4	26,7	3,9	19,7	1,2	28,9	2,5	30,4	2,6	31,2	0,9	29,3	3,1	22,0	1,3
Torrecilla de C.	27,2	0,8	31,2	1,8	30,4	2,9	22,7	0,6	19,5	0,5	33,2	1,6	30,6	2,2	31,9	1,3	30,1	4,2	21,8	2,4
Graus	31,2	0,8	31,1	0,8	28,2	0,9	23,9	0,3	19,8	0,5	30,3	0,9	30,5	3,3	24,7	1,6	26,4	0,5	21,7	0,6
Tartareu	29,7	,	30,3	0,4	28,4	1,5	24,8	1,1	19,8	0,5	30,5	1,3	29,5	2,7	26,1	4,1	25,3	1,8	22,7	2,8
Villahermosa del R.	32,0	2,4	31,8	1,8	30,7	3,8	27,0	4,7	19,6	,	30,9	1,6	29,7	0,8	31,2	0,8	26,5	1,7	20,8	0,6



**Tabla 8** Valor medio y desviación estándar del contenido en lignina ácido detergente (%) de la materia seca, en cada corte, de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C.	7,7	0,4	8,0	0,5	8,6	0,1	9,6	0,7	7,5	0,1	7,5	0,2	8,1	0,3	9,2	0,7	10,4	0,2	8,8	0,5
Somborne	7,1	0,3	8,5	0,3	8,4	0,3	10,1	0,0	7,4	0,4	6,9	0,8	7,6	0,3	8,1	0,7	11,5	0,0	7,6	0,9
Esparcette	8,3	0,5	8,2	0,2	8,0	0,1	9,0	0,5	8,0	1,3	7,7	0,2	8,6	0,7	7,6	0,5	9,5	1,6	8,5	1,9
Sepial	7,5	0,0	8,3	0,4	7,7	0,4	8,9	0,4	7,3	0,7	7,0	0,7	7,8	0,1	8,2	0,4	10,8	0,0	7,5	,
Ambra	7,3	0,3	8,4	0,1	8,2	0,1	10,3	1,0	8,0	0,3	8,6	0,3	8,2	0,2	8,4	0,4	10,3	0,3	8,6	0,8
Fakir	6,9	0,1	8,3	0,3	8,2	0,7	10,6	1,0	6,9	0,4	7,4	0,7	7,9	0,8	8,1	0,4	10,1	0,2	8,9	1,0
Ucrania	7,7	0,4	8,4	0,5	8,0	0,2	9,3	1,0	7,0	0,6	7,2	0,9	8,2	0,8	8,6	1,1	10,0	1,3	8,6	0,4
Incoronata	8,2	0,4	8,5	0,4	8,3	0,4	10,4	0,4	7,4	0,7	8,2	0,1	7,8	0,2	8,2	0,5	11,0	0,6	8,4	1,5
Visnovsky	7,7	0,4	8,2	0,1	7,5	0,4	9,7	1,0	7,5	0,3	8,4	0,5	7,9	0,1	8,2	0,2	10,8	0,6	9,3	0,6
Yubileyna	7,4	0,1	8,3	0,3	7,6	0,2	9,8	0,9	7,5	0,9	8,3	0,1	7,9	0,2	8,0	0,0	9,6	0,0	8,7	0,4
Korunga	7,7	0,3	8,4	0,3	7,6	0,3	9,9	0,6	8,4	0,5	8,4	0,2	8,2	0,5	8,2	0,2	10,6	0,9	8,4	0,3
Polonia	7,7	0,3	8,6	0,3	8,0	0,3	10,1	0,8	7,9	0,3	8,3	0,2	8,3	0,3	8,2	0,1	9,9	1,3	9,7	1,1
Selección 9.2	6,8	0,1	8,3	0,2	7,5	0,9	9,7	0,4	7,6	0,6	7,4	0,8	7,9	0,1	8,3	0,1	9,8	0,3	7,3	0,4
Reznos	7,4	0,1	8,2	0,3	8,1	0,4	9,5	0,3	7,5	0,2	6,4	0,9	7,7	0,4	7,5	0,3	10,4	0,8	8,0	0,3
Selección 7.1	7,6	0,1	8,4	0,3	8,1	0,5	10,4	0,5	7,5	0,3	7,3	0,5	7,7	0,0	8,1	0,3	10,8	1,1	7,8	0,5
Mezquita de J.	7,0	0,4	8,2	0,7	8,3	0,3	10,5	0,7	7,5	0,5	6,8	0,4	7,8	0,3	7,9	0,4	10,4	0,2	8,6	0,7
Lagueruela	7,6	0,3	8,2	0,4	8,3	0,2	9,8	0,7	7,5	0,1	7,2	0,5	8,1	0,3	8,3	0,4	10,6	0,3	7,8	0,7
Loarre	7,5	0,3	8,4	0,6	8,2	0,1	10,1	,	7,1	0,6	7,3	0,2	8,2	0,4	8,3	0,4	10,8	0,7	7,9	0,5
Villahoz	7,1	0,5	8,1	0,8	8,3	0,4	10,1	0,6	7,2	0,9	6,6	0,4	8,0	0,1	8,2	0,0	11,0	0,5	8,7	0,7
Torrecilla de C.	6,8	0,5	7,9	0,4	8,5	0,6	9,2	0,3	7,6	0,7	7,2	0,5	7,7	0,7	7,6	0,4	9,6	0,3	8,4	0,8
Graus	7,9	0,3	7,8	0,2	8,0	0,3	9,8	0,8	7,4	0,4	7,0	0,5	7,9	0,2	8,2	0,4	9,9	1,1	8,5	0,4
Tartareu	7,3	,	8,3	0,8	8,1	0,6	10,2	0,4	7,3	0,5	7,1	0,6	7,9	0,4	7,9	0,1	10,4	0,2	8,9	1,0
Villahermosa del R.	7,9	0,3	7,9	0,2	8,3	0,5	10,2	1,0	7,2	,	7,4	0,1	7,8	0,1	8,8	0,2	10,5	0,4	8,8	1,4

**Tabla 9** Valor medio y desviación estándar del contenido en proteína bruta (%) de la materia seca en cada corte de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C,	20,1	0,4	20,2	2,2	20,4	1,0	19,6	0,2	24,3	0,3	16,0	1,0	19,1	2,2	18,2	3,6	16,8	0,1	23,0	1,4
Somborne	19,3	0,1	19,4	0,1	18,6	1,1	18,4	0,4	22,8	0,6	15,9	0,3	17,3	2,1	19,8	2,0	15,3	1,0	24,4	1,3
Esparcette	17,0	2,1	18,6	0,8	19,6	1,7	18,7	0,2	22,7	0,7	13,5	2,9	18,5	1,7	21,3	1,4	16,7	0,7	22,8	3,9
Sepial	16,2	0,6	18,7	2,2	20,4	1,3	24,0	1,0	25,2	1,7	17,4	2,2	15,9	0,9	17,3	1,1	12,0	1,8	27,0	,
Ambra	18,7	0,6	15,9	1,9	19,7	1,6	18,9	1,7	23,3	1,9	13,6	1,2	18,4	1,6	18,8	1,1	14,2	1,2	24,6	1,8
Fakir	19,0	3,5	16,9	1,9	19,3	2,1	16,6	2,3	24,2	1,3	14,7	1,7	18,0	2,0	19,6	1,7	15,2	1,5	21,0	1,6
Ucrania	17,2	2,0	18,1	2,0	17,4	1,2	16,9	2,2	24,8	0,6	14,2	2,0	15,8	2,5	15,9	1,7	16,2	0,6	21,5	0,5
Incoronata	19,1	0,3	18,2	2,7	19,3	1,5	17,1	0,7	26,2	2,7	15,0	0,9	20,1	2,6	17,1	2,0	13,4	1,1	26,2	1,0
Visnovsky	13,5	0,6	19,5	0,9	19,3	2,2	17,9	2,9	23,7	1,9	12,5	0,9	16,9	1,4	17,7	0,2	11,0	1,4	21,3	0,7
Yubileyna	17,4	2,3	17,7	1,7	19,6	1,8	17,8	0,5	23,7	0,5	12,3	1,5	16,5	3,5	23,6	0,2	15,9	1,6	24,8	2,5
Korunga	17,0	1,5	17,3	2,5	22,1	1,8	18,7	1,9	24,8	0,3	13,9	1,9	18,8	1,6	23,6	0,5	13,6	2,7	23,6	0,5
Polonia	16,8	1,9	16,4	1,3	19,7	1,4	21,0	1,6	24,4	0,5	13,7	1,8	17,0	1,8	25,6	0,6	12,6	0,2	21,9	2,0
Selección 9,2	19,6	1,2	19,0	1,2	19,5	0,7	18,5	1,2	26,3	1,1	15,8	0,7	15,8	0,2	17,3	1,6	14,5	0,5	24,8	0,9
Reznos	18,8	1,0	17,6	2,3	26,2	2,2	17,5	2,0	25,2	1,1	13,0	3,3	17,5	2,1	16,9	1,5	13,1	2,6	25,6	1,6
Selección 7,1	19,1	1,8	19,5	1,4	16,4	1,3	16,8	2,6	24,7	1,9	13,6	2,2	17,9	3,9	19,8	1,1	14,8	0,9	26,2	0,7
Mezquita de J,	18,6	2,0	17,0	3,5	18,9	0,2	18,2	2,3	23,2	1,7	17,0	1,5	18,7	2,6	21,0	2,7	15,6	0,7	24,2	0,6
Lagueruela	17,5	1,9	16,8	2,0	17,4	1,3	18,5	1,0	23,9	1,9	15,7	0,7	17,8	0,8	17,4	1,1	15,9	2,6	24,8	0,5
Loarre	17,4	0,8	18,3	0,7	19,1	0,0	16,6	,	25,1	2,1	15,1	0,5	18,2	1,2	18,5	2,8	15,7	0,5	26,2	1,7
Villahoz	18,1	1,9	19,4	0,9	19,2	1,6	16,6	2,0	24,2	0,7	16,3	1,5	18,8	2,5	18,8	0,6	15,0	2,1	24,0	0,8
Torrecilla de C,	19,4	0,6	18,8	3,1	18,4	1,8	22,5	0,4	24,0	0,2	14,1	1,4	18,7	1,6	16,8	1,7	13,7	1,9	24,8	1,7
Graus	19,8	1,0	19,4	1,2	20,7	1,4	19,1	0,9	24,6	0,8	16,5	0,1	18,8	1,6	21,8	3,1	17,8	0,1	25,3	0,9
Tartareu	18,1	,	19,1	1,3	20,8	1,9	18,5	1,3	24,6	1,8	16,1	0,3	19,5	2,3	20,6	2,3	17,0	1,7	22,3	1,8
Villahermosa del R,	18,9	0,9	19,4	0,6	18,6	1,6	17,2	1,7	24,6	,	16,1	0,6	19,0	2,4	18,0	1,0	17,0	1,2	23,7	0,5

**Tabla 10** Valor medio y desviación estándar del contenido en taninos condensados (%) de la materia seca, en cada corte, de una colección de esparcetas durante 2008 y 2009.

Corte → Variedad ↓	C1.1		C1.2		C1.3		C1.4		C1.5		C2.1		C2.2		C2.3		C2.4		C2.5	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Cotswold C.	1,7	0,1	1,3	0,3	2,6	0,7	2,3	0,6	2,2	,	1,8	0,4	2,2	0,6	3,0	1,1	2,9	0,4	2,7	0,3
Somborne	1,5	0,3	1,7	0,5	1,7	0,3	3,2	0,1	2,1	0,3	1,6	0,1	2,0	0,4	3,1	0,3	2,6	0,3	2,4	0,5
Esparcette	1,1	0,2	1,0	0,2	2,2	0,9	2,8	0,7	2,4	0,5	1,5	0,2	1,5	0,3	2,3	0,2	3,1	0,9	1,9	0,9
Sepial	1,5	0,3	1,2	0,3	1,0	0,1	2,6	0,1	1,8	0,2	1,6	0,2	1,0	0,6	1,8	0,7	1,8	0,3	2,0	,
Ambra	1,4	0,2	1,0	0,4	2,6	0,6	2,2	0,7	2,5	0,4	1,2	0,1	1,8	0,1	2,1	0,7	2,9	0,8	2,3	0,5
Fakir	1,2	0,5	1,1	0,1	1,6	0,2	3,2	0,8	2,1	0,4	1,1	0,2	1,5	0,2	2,3	0,8	2,5	0,6	3,0	0,5
Ucrania	1,7	0,4	0,9	0,3	1,8	0,7	2,9	0,9	2,1	0,8	1,6	0,7	2,0	0,8	2,8	0,3	3,1	0,3	2,9	0,1
Incoronata	0,8	0,3	1,5	0,2	0,7	0,6	2,6	0,5	1,9	0,1	1,7	0,3	1,9	0,2	2,1	0,5	2,3	0,3	2,5	0,2
Visnovsky	1,1	0,1	1,2	0,1	0,8	0,3	2,5	1,0	2,1	0,2	1,4	0,4	1,4	0,4	1,7	0,5	1,9	0,9	2,7	0,9
Yubileyna	1,6	0,2	1,0	0,2	1,9	0,5	2,9	0,5	2,6	0,5	1,3	0,2	1,8	0,5	2,5	0,9	2,6	0,9	2,7	0,7
Korunga	1,2	0,1	0,8	0,3	2,3	0,7	3,1	0,3	1,9	0,4	1,1	0,3	1,8	0,4	2,9	0,4	2,4	0,8	2,6	0,3
Polonia	1,4	0,3	1,0	0,3	2,7	0,8	2,2	0,9	1,9	0,4	1,5	0,2	2,0	0,6	2,9	0,5	2,5	0,7	2,6	0,2
Selección 9.2	1,4	0,7	1,3	0,3	0,7	0,1	2,9	0,0	2,0	0,3	1,2	0,3	1,6	0,1	2,1	0,8	2,3	0,3	2,3	0,2
Reznos	1,0	0,1	1,0	0,2	2,0	0,5	3,3	0,6	2,3	0,6	1,6	0,3	1,3	0,2	1,9	0,2	2,0	0,4	2,8	0,2
Selección 7.1	1,5	0,3	1,2	0,3	1,0	0,4	2,3	0,8	2,0	0,3	1,1	0,4	1,9	0,3	2,7	0,3	2,3	0,8	2,0	0,4
Mezquita de J.	1,5	0,2	1,2	0,5	1,8	0,2	3,3	0,3	2,1	0,5	1,7	0,4	1,5	0,3	2,6	0,3	2,3	0,8	2,1	0,3
Lagueruela	1,3	0,5	0,7	0,4	1,6	0,4	3,0	0,8	2,4	0,0	1,3	0,1	1,6	0,1	1,3	0,2	2,4	0,4	1,9	0,1
Loarre	1,1	0,1	1,0	0,1	1,0	0,1	2,2	,	2,3	0,5	1,3	0,1	1,2	0,5	2,2	0,2	2,5	0,4	2,3	0,1
Villahoz	1,1	0,1	1,3	0,1	1,1	0,3	3,5	1,3	1,9	0,3	1,5	0,4	1,4	0,4	1,5	0,2	2,8	0,5	2,7	0,8
Torrecilla de C.	1,4	0,3	0,8	0,2	1,4	0,4	2,7	0,4	2,0	0,5	1,2	0,2	1,3	0,3	1,4	0,2	2,4	0,9	2,4	0,6
Graus	1,2	0,2	1,3	0,2	1,9	0,2	3,0	0,6	1,8	0,1	1,4	0,3	1,5	0,5	2,9	0,6	2,5	0,6	2,0	0,4
Tartareu	1,8	,	1,1	0,2	1,6	0,2	2,9	0,5	2,1	0,1	1,5	0,2	1,4	0,4	2,9	0,9	2,8	0,6	2,8	0,5
Villahermosa del R.	1,1	0,1	1,1	0,2	1,7	0,4	2,8	0,4	2,2	,	1,5	0,1	1,3	0,4	2,5	0,1	2,8	0,7	2,2	0,2

**Tabla 11** Correlaciones entre los contenidos en cenizas (Cz), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD), proteína bruta (PB), taninos condensados (TC), mortalidad, producción de materia seca, intensidad de floración y porte en una colección de esparcetas durante el periodo 2007-2009.

	Cz	FND	FAD	LAD	PB	TC	Mortalidad	PMS	Porte
				ns	*	*		***	***
Intensidad de floración	/	/	/		r=-0,30	r=-0,28	ns	r=-0,28	r=-0,28
	***	*	***	***	***	***		*	
Porte	r=+0,43	r=-0,10	r=-0,40	r=+0,24	r=+0,24	r=+0,36	ns	r=+0,27	
	***	***	***	***	***	***	*		
Producción de materia seca (PMS)	r=-0,54	r=+0,22	r=+0,56	r=-0,33	r=-0,42	r=-0,56	r=-0,24		
	**			**	*	***			
Mortalidad	r=-0,14	ns	ns	r=-0,10	r=-0,10	r=-0,14			

ns, \*, \*\*, \*\*\* significación de la F al nivel de probabilidad  $P > 0,05$ ;  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente.





## Ensayo II: Amplificación inter-genérica de EST-SSRs y similitud genética en el género *Onobrychis*<sup>1</sup>

### I. OBJETIVOS

Este ensayo pretende la caracterización de una colección de esparcetas y la evaluación preliminar de su diversidad genética mediante el uso de microsatélites EST-SSR. En ausencia de *loci* de microsatélites disponibles en el género *Onobrychis*, se evaluó la transferibilidad de marcadores de microsatélites de *Medicago* y *Glycine* a especies de *Onobrychis*.

### II. MATERIAL Y MÉTODOS

#### II.1 Material vegetal y extracción de ADN

Se utilizaron, 23 variedades de esparceta, las cuales se muestran en la **Tabla II.1**. Doce de ellas fueron variedades europeas que representan el material comercial disponible, nueve fueron variedades locales, seleccionadas por su diversidad en el estudio efectuado sobre una colección de 38 muestras de semilla de productores de semillas del cuadrante noreste de España (Delgado *et al.*, 2008), y las dos últimas selecciones obtenidas siguiendo criterios de mayor persistencia o producción en el CITA. Dos especies silvestres del mismo género procedentes del Pirineo, *O. pyrenaica* (Sennen) y *O. argentea* (Boiss), fueron incluidas para estimar su similitud con *O. viciifolia* y entre ellas mismas y, por último, *Trifolium repens* fue utilizado como grupo externo (**Tabla II.1**). Adicionalmente, material de *Medicago truncata* (Gaertn) y *T. repens* fue empleado como testigo positivo para probar la transferibilidad (o transferencia) de los SSRs.

Para la extracción de ADN, se muestrearon hojas jóvenes y sanas en diez plantas, seleccionadas de modo aleatorio, de cada una de las variedades objeto de estudio. Estas variedades procedían del estudio agronómico de la colección de variedades (Ensayo I), en el que se utilizaban 30 plantas por variedad. El ADN genómico fue extraído utilizando el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1987) modificado por Hormaza (1999), según se recoge en el Anexo IV. El ADN extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría y diluido a 10 ng/μl previamente a la amplificación por PCR. Para probar la transferibilidad de los SSRs, se emplearon muestras de ADN constituidas por un individuo cada vez; para la caracterización de las variedades y la amplificación de los SSRs se emplearon muestras resultantes de la mezcla de una cantidad equivalente de ADN diluido de diez individuos.

---

<sup>1</sup> Demdoun S, Valderrabano J, Delgado I, Muñoz F, Wünsch A (2011). EST-SSR cross-amplification and genetic similarity in *Onobrychis* genus. Genetic Resources and Crop Evolution. DOI 10.1007/s10722-011-9681-x (Anexo 3).

**Tabla II.1** – Relación y origen de los 27 genotipos analizados del género *Onobrychis*.

<b>Especie</b>	<b>Variedad</b>	<b>Nº de orden</b>	<b>Origen</b>	<b>Proveedor</b>
<i>O. viciifolia</i>	Ambra	5	Italia	Caussade semences (Fr)
<i>O. viciifolia</i>	Cotswold common	1	Reino Unido	Cotswold seeds (UK)
<i>O. viciifolia</i>	Esparcette	3	Polonia	Cotswold seeds (UK)
<i>O. viciifolia</i>	Fakir	6	Francia	INRA (Fr)
<i>O. viciifolia</i>	Incoronata	8	Italia	INEA Bari (It)
<i>O. viciifolia</i>	Korunga	11	Turquia	Agricultural Faculty, Izmir
<i>O. viciifolia</i>	Polonia	12	Polonia	Rocalba S.A.(Spain)
<i>O. viciifolia</i>	Sepial	4	Francia	Caussade semences (Fr)
<i>O. viciifolia</i>	Somborne	2	Reino Unido	Cotswold seeds (UK)
<i>O. viciifolia</i>	Ukrania	7	Ukrania	Rocalba S.A.(Spain)
<i>O. viciifolia</i>	Visnovsky	9	R. Checa	Research Inst. for Fodder Crops
<i>O. viciifolia</i>	Yubileyna	10	Bulgaria	Forage Research Inst., Pleven
<i>O. viciifolia</i>	Graus	21	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Lagueruela	17	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Loarre	18	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Mezquita	16	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Reznos	14	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Selección 1	15	España	Selección CITA
<i>O. viciifolia</i>	Selección 2	13	España	Selección CITA
<i>O. viciifolia</i>	Tartareu	22	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Torrecilla de Cameros	20	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Villahermosa del Río	23	España	Variedad local
<i>O. viciifolia</i>	Villahoz	19	España	Variedad local
<i>O. argentea</i>			España	Especie silvestre
<i>O. pyrenaica</i>			España	Especie silvestre
<i>Medicago truncatula</i>			España	Variedad genérica
<i>Trifolium repens</i>			España	Especie silvestre

## II.2 Análisis de los SSRs

Se probó la transferibilidad a *O. viciifolia* de 27 microsatélites seleccionados de *M. truncatula* y *Glycine max* (I) Merr. (Gutierrez *et al.* 2005; Peakall *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2007), previamente amplificados en otras especies de leguminosas (Gutierrez *et al.* 2005; Peakall *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2007). La relación de dichos microsatélites figura en la **Tabla II.2**.



Las reacciones de PCR fueron realizadas en volúmenes de 20 µl conteniendo 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM de KCl, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada cebador, 40 ng de ADN genómico y 0,45 unidades de polimerasa Taq (Life Technologies, USA).

Las reacciones se realizaron en un iCycler thermocycler (BioRad, USA) utilizando el siguiente perfil de tiempos y temperaturas: un periodo inicial de 2 min a 94°C, 35 ciclos seguidos de 45 s a 94°C, 45 s a Ta y 1 min a 72°C, y un periodo final de 5 min a 72°C, siendo Ta es la temperatura de hibridación (annealing temperature), optimizada para cada *locus* de SSR. Los productos obtenidos de la PCR fueron separados por electroforesis usando geles de agarosa ‘Metaphor’ al 3% (FMC Bioproducts) en tampón de 1x TBE a 5 V/cm, teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante luz UV. Los ADN de *M. truncatula* y *T. repens* fueron empleados como controles positivos en las reacciones de PCR para comprobar la correcta amplificación de los SSRs en una especie en la cual su presencia es conocida. La medición de las bandas fue realizada por comparación con tamaños estándares de ADN (10bp o 1kb, Life Technologies), en función del rango de amplificación del SSR.

**Tabla II.2** – Listado de los microsatélites analizados en *Onobrychis* y transferibilidad y polimorfismo en otras especies.

<b>Locus</b>	<b>Especie original</b>	<b>Amplificación en otras especies</b>	<b>Referencia</b>	<b>Transferibilidad y polimorfismo en <i>Onobrychis</i></b>
AG81	G	V, P, L	Peakall et al. 1998	p
AW567861	G	T	Zhang et al. 2007	p
BE608020	G	T	Zhang et al. 2007	na
MtBA01B04R2	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p*
MtBA27D09F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p
MtBA29B03F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	np
MtBA25E01F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	np
MtBA28E09F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	np
MtBC27H11F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	na
MtBA09E01R1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	na
MtBB36F05F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p*
MtBA04C08R1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p
MtBA32A12R1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	np
MtBA37D08F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	na
MtBB36E02F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	np
MtBB22G10F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p
MtBC47B06F1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p*
MtBA02H03F3	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	np
MtBB44F02R1	M	V, P, C	Gutierrez et al. 2005	p*
BI74	M	T	Zhang et al. 2007	p*
AL79	M	T	Zhang et al. 2007	p*
BG178	M	T	Zhang et al. 2007	p
BE74	M	T	Zhang et al. 2007	na
AW64	M	T	Zhang et al. 2007	np
AL46	M	T	Zhang et al. 2007	p
AW306	M	T	Zhang et al. 2007	np
AW265	M	T	Zhang et al. 2007	p

na: no amplificado; np: no polimórfico; p: polimórfico; \*: SSR seleccionado para la caracterización de *O. viciifolia*. *Medicago truncatula* (M), *Glycine max* (G), *Vicia faba* (V), *Pisum sativum* (P), *Cicer arietinum* (C), *Lupinus angustifolium* (L), *Trifolium repens* (T).

Los SSRs amplificadas en *Onobrychis* que permitieron una medición clara de los alelos de SSR fueron seleccionados para la caracterización de todas las variedades. Seis de los SSRs (**Tabla II.3**) fueron seleccionados y evaluados en los 25 genotipos de *Onobrychis* y *T. repens*. Todas las amplificaciones de PCR se repitieron por lo menos dos veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

### II.3 Análisis de los datos

El contenido de información del polimorfismo (PIC, Polymorphic Information Content) de cada uno de los SSRs analizados, fue calculado usando la fórmula:

$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$  (Botstein *et al.* 1980) donde  $P_{ij}$  es la frecuencia del alelo ' $i$ '<sup>n</sup> para el marcador ' $i$ ' en la población ' $j$ '<sup>n</sup>. La similitud genética, a partir de la información generada por los SSR, fue estimada utilizando el índice de Nei y Li (1979). Los cálculos se realizaron usando el programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf 2002). Los genotipos se agruparon en base a la información genética generada mediante un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa Genalex (Peakall y Smouse 2006).

**Tabla II.3** – Número de alelos, valor de PIC y rango de tamaño de amplificación de seis SSRs analizados en 23 variedades de esparceta.

SSR	Número de alelos	Rango en <i>M. truncatula</i> (pb.)	Rango en <i>O. viciifolia</i> (pb.)	PIC
MtBA01B04R2	7	400-370	420-333	0,84
MtBB36F05F1	5	220-180	220-180	0,82
MtBC47B06F1	6	110	779-466	0,80
MtBB44F02R1	5	140-130	237-143	0,58
BI74	7	177-79	865-79	0,85
AL79	5	240	506-389	0,45
<b>Total</b>	<b>35</b>			

PIC: contenido de información de polimorfismo, SSR: microsátélites, pb: par de bases.

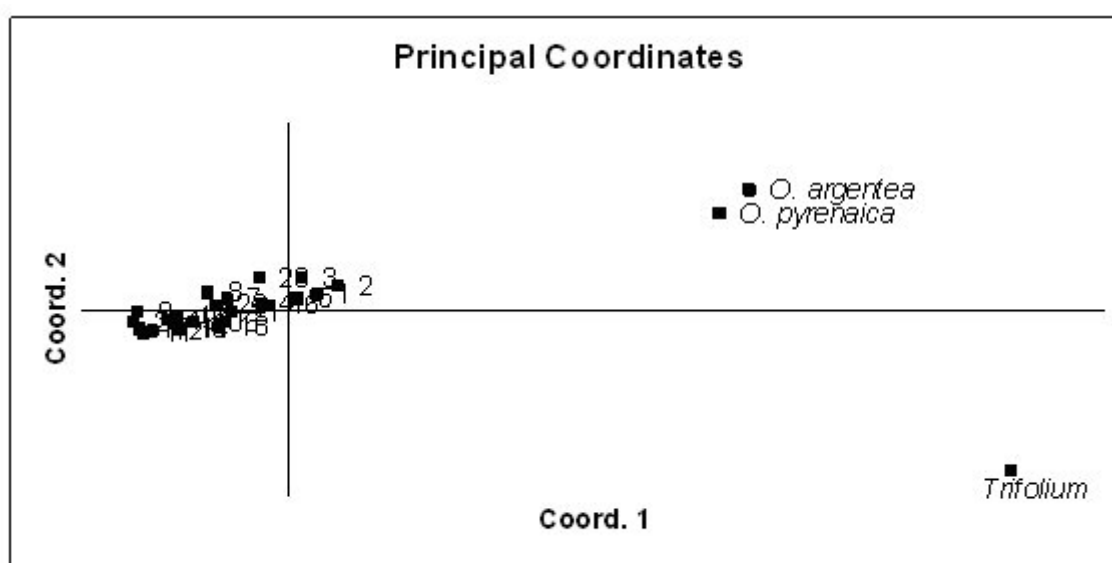
### III. RESULTADOS

Los 27 SSRs analizados se amplificaron correctamente en *M. truncatula*, especie en la cual fueron aislados, o en *T. repens*, otra especie en la cual su transferibilidad fue ya probada (**Tabla II.2**). En las especies de *Onobrychis*, una amplificación consistente se obtuvo en 22 (81%) de los 27 microsátélites testados (**Tabla II.2**), una vez establecidas las temperaturas de hibridación adecuadas para cada microsátélite. Sin embargo, el tamaño de amplificación de los distintos SSRs fue, en general, mayor en *O. viciifolia*, 79 a 865bp, que el previamente descrito en *M. truncatula*, 79 a 240bp.

Catorce de los 22 SSRs fueron polimórficos en las tres especies de *Onobrychis*, según se muestra en la **Tabla II.2**, y seis de ellos fueron seleccionados para la caracterización de los genotipos de esparceta, lo que permitió una detección clara de las bandas y un fácil reconocimiento (**Tabla II.2**). Un total de 35 alelos fueron detectados usando los seis microsátélites en las 25 poblaciones de *Onobrychis*. Cada uno de los SSR amplificados detectó entre 5 y 7 alelos, siendo el número de alelos medio por SSR de 5,83 (**Tabla II.3**). Los valores de PIC, calculados para cada SSR en los 25 genotipos (**Tabla II.3**), oscilaron entre 0,45 y 0,85, con una media de 0,72. El microsátélite BI74 fue el SSR que reveló el polimorfismo más alto en el material probado.

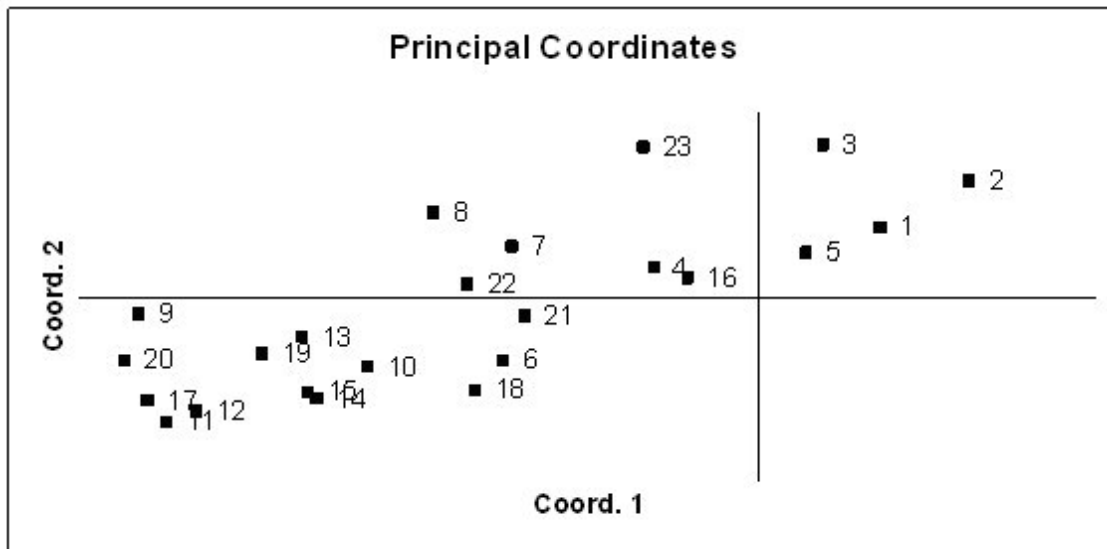
Las variedades de *O. viciifolia* mostraron una similitud genética alta entre ellas; ésta fue menor entre *O. viciifolia* y las especies silvestres de *Onobrychis*, *O. argentea* y *O. pyrenaica*. Estas dos especies se mostraron estrechamente relacionadas, con una similitud genética de 0,95. Por otra parte, *T. repens* destacó por tener solo 0,23 de similitud con el conjunto de las especies de *Onobrychis*.

El análisis de seis SSRs en 23 poblaciones de *O. viciifolia*, en *O. pyrenaica*, *O. argentea* y *T. repens*, produjo un perfil genético único para cada población, permitiendo la diferenciación de cada una de las 26 poblaciones. Los dos primeros vectores de Eigen del análisis de componentes principales expresaron el 60,1% de la variación observada. Como resultado de este análisis, se observó una diferenciación clara entre *T. repens* y todas las especies de *Onobrychis* como se muestra en la **Figura III.1**. Las dos especies silvestres *O. argentea* y *O. pyrenaica*, se agruparon aparte y se mostraron claramente separadas de las variedades de *O. viciifolia* y de *T. repens*.



**Fig. III.1** Diagrama de dispersión representando el análisis de PCA de las similitudes genéticas entre *O. pyrenaica*, *O. argentea*, *T. repens* y 23 variedades de *O. viciifolia*, basada en 6 loci de microsatélites (Genalex 6.1)

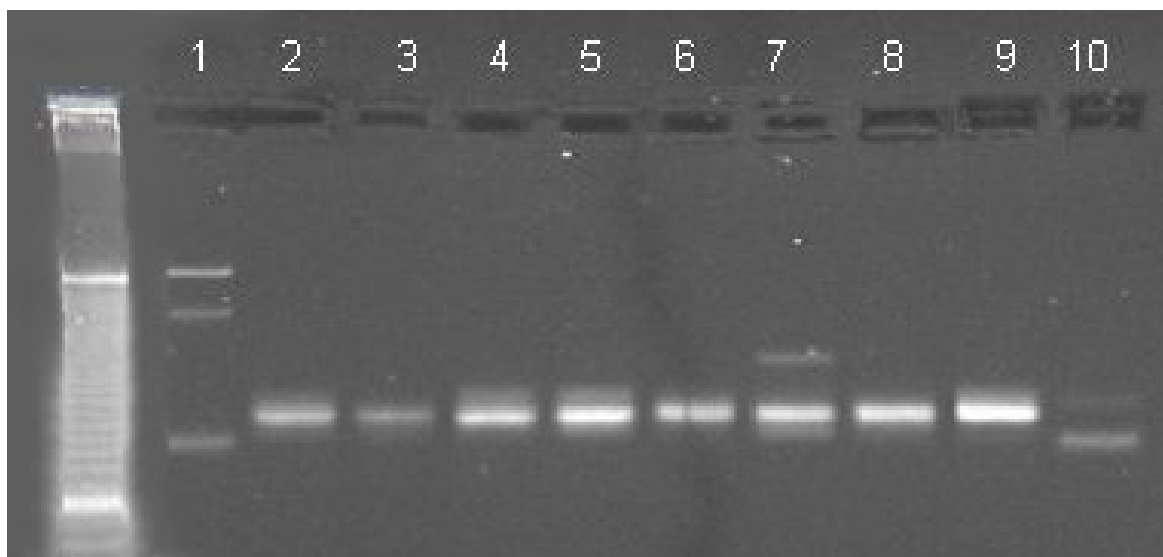
Analizadas por separado las 23 variedades de *O. viciifolia*, como se muestra en la **Figura III.2**, aparece un grupo genéticamente diverso. Entre estas variedades, ‘Cotswold common’ (1), ‘Somborne’ (2), ‘Esparcette’ (3), ‘Ambra’ (5), ‘Sepial’ (4), ‘Mezquita de Jarque’ (16) y ‘Villahermosa del Río’ (23) constituyeron un subgrupo amplio, distante de otro subgrupo, más compacto, incluyendo ‘Ukrania’ (7), ‘Incoronata’ (8), ‘Selection 1’ (15), ‘Lagueruela’ (17), ‘Loarre’ (18), ‘Reznos’ (14), ‘Visnovsky’ (9), ‘Polonia’ (12), ‘Korunga’ (11), ‘Yubilena’ (10), ‘Torrecilla de Cameros’ (20), ‘Villahoz’ (19), ‘Selection 2’ (13), ‘Graus’ (21) y ‘Tartareu’ (22). Las variedades británicas, ‘Cotswold Common’ y ‘Somborne’, fueron las más distantes de las variedades de Europa del Este como ‘Visnovsky’, ‘Polonia’ y ‘Korunga’. Las variedades francesas e italianas ‘Ambra’, ‘Sepial’, ‘Incoronata’ y ‘Fakir’ ocuparon posiciones intermedias entre las variedades británicas y de Europa del Este. Las variedades españolas como ‘Mezquita de Jarque’, ‘Selection 1’, ‘Lagueruela’, ‘Loarre’, ‘Reznos’, ‘Torrecilla de Cameros’, ‘Villahoz’, ‘Selection 2’, ‘Graus’ y ‘Tartareu’ se distribuyeron entre las variedades francesas, italianas y de Europa del Este.



**Fig. III.2** Diagrama de dispersión representando el análisis de PCA de las similitudes genéticas entre *O. pyrenaica*, *O. argentea*, *T. repens* y 23 variedades de *O. viciifolia*, basada en 6 loci de microsatélites (Genalex 6.1), ampliación sobre las variedades *O. viciifolia*

#### IV. DISCUSIÓN

Con el fin de caracterizar y evaluar la diversidad genética de la esparceta, se evaluó la transferibilidad de loci de microsatélites derivados de especies de leguminosas *M. truncatula*, *Glycine* sp. y *T. repens*, a *O. viciifolia* y a las especies silvestres *O. argentea* y *O. pyrenaica*. Los loci de SSRs tranferibles se seleccionaron siguiendo un criterio de polimorfismo y reproducibilidad, y los elegidos fueron utilizados para la caracterización y la evaluación de la similitud genética de 23 variedades de esparceta, como muestra se incluye un ejemplo en la **Figura IV.1**.



**Figura IV.1.** Fragmentos de amplificación obtenidos utilizando los cebadores del locus de microsatélites de *Glycine* AG81 en *Medicago* (pozo 1) y genotipos de *O. viciifolia* (pozos de 2 a 12), con escalera estándar de 10 bp.

#### IV.1 Transferibilidad inter-genérica

La proporción de microsatélites transferibles entre *Medicago* y *Onobrychis* (81%) fue superior a los datos previamente publicados de amplificación entre géneros. La amplificación intra-género es habitualmente cercana al 50% (Eujayl *et al.* 2004; Peakall *et al.* 1998) y decrece entre géneros. Zhang *et al.* (2007) encontraron 18-22% de transferibilidad desde *Medicago* a *Trifolium*, pero Peakall *et al.* (1998) señalaron únicamente 1-3% de transferibilidad para los SSRs de *Glycine* en otros géneros de leguminosas. En este trabajo se emplearon EST-SSR que están más conservados que los SSR genómicos (Peakall *et al.* 1998; Scott *et al.* 2000). Además, los SSR analizados para estudiar su transferibilidad habían sido seleccionados entre marcadores que habían mostrado su conservación entre géneros. De este modo el nivel alto de transferibilidad encontrado aquí indica que la selección de SSR conservados en otros géneros es una estrategia eficaz para la identificación de SSR transferibles en nuevas especies. A pesar del carácter conservado de los EST-SSRs, que puede limitar su polimorfismo, una proporción alta de microsatélites fueron polimórficos en *Onobrychis*, llegando al 63% en los SSRs analizados. Seis de ellos fueron seleccionados y mostraron valores altos de PIC (0,72 de promedio) lo que indica su utilidad para estudios moleculares en *O. viciifolia*.

El número de alelos por *locus* observados en *Onobrychis* osciló entre 5 y 7, que son valores más bajos que lo previamente observado en alfalfa (4 a 14) (Falahati-Anbaran *et al.* 2004). Dado que la esparceta es una especie tetraploide y que las variedades estaban representadas por mezclas de 10 individuos, el número de alelos detectados parece ser bajo. Ello puede ser el resultado de varios factores, principalmente, el método de detección empleado y la electroforesis en gel de agarosa, que no es suficientemente sensible para distinguir entre alelos con poca diferencia de tamaño y puede obviar alelos amplificados. Sin embargo, trabajando con una especie tetraploide, una primera evaluación del material vegetal mediante electroforesis horizontal permite la visualización de los *loci* amplificados y facilita la evaluación preliminar de los marcadores. Métodos de detección más sensibles, como la electroforesis capilar, pueden producir *a priori* patrones de fragmentos difíciles de interpretar debido al solapamiento de alelos. Por otra parte, la amplificación por PCR de mezclas de ADN de diez individuos puede dar lugar a que los alelos menos frecuentes se pierdan frente a la amplificación preferencial de los alelos más comunes. Ello puede ocasionar que ciertos alelos presentes en la población no sean detectados, llevando a una subestimación del número de alelos detectados por *loci* en cada población.

En varios SSR (como MtBC47B06F1 y MtBB44F02R1) se observaron patrones complejos, indicando que puede haber ocurrido la amplificación simultánea de varios *loci*. La generación de productos múltiples durante una amplificación inter-específica puede ocurrir por mutación, reordenamiento y duplicación en la región adyacente y/o cambios en el número de repeticiones (Peakall *et al.* 1998), como indicaron Gutierrez *et al.* (2005) utilizando EST-SSR en leguminosas.

#### IV.2 Similitud genética

El nivel de polimorfismo mostrado por los seis microsatélites seleccionados permitió definir un perfil genético único para cada población. El análisis de componentes principales discriminó a todas las variedades de *O. viciifolia*, de *T. repens* y las especies silvestres de, *O. argentea* y *O. pyrenaica*, las cuales fueron muy similares entre si.

Ello es sorprendente porque morfológicamente *O. argentea* es más parecida a *O. viciifolia* que a *O. pirenaica*.

Todas las variedades de esparceta comparten un coeficiente de similitud por encima de 0,80, conforme a los resultados de Sardaro *et al.* (2003), los cuales encontraron un nivel de 0,73 entre variedades de esparceta con análisis de AFLP. El alto nivel de similitud encontrado entre las variedades de esparceta sugiere que éstas están más estrechamente relacionadas entre sí que en el caso de variedades de *Trigononella foenum-graecum* (L.) (0,66, Dangi *et al.* 2004) o de *Phaseolus coccineus* (L.) (o *P. vulgaris* (L.) (0,6 y 0,75, Sicard *et al.* 2005), que son los cultivos de leguminosas más antiguamente domesticados.

La distribución de los genotipos de *O. viciifolia* en el análisis de PCA muestra una relación con la distribución geográfica de estas variedades, situándose las variedades británicas más distantes del resto, las de Europa del Este agrupadas y distantes de las británicas, y las francesas e italianas entre ambos grupos. Las variedades británicas ‘Cotswold Common’ y ‘Somborne’ se diferenciaron claramente del resto del material, lo que puede ser debido al aislamiento del germoplasma británico y a los escasos intercambios de semillas con el resto del continente desde los años 1980 (Aldrich 1984). Solo la variedad de Europa del Este ‘Espacelette’, de Polonia, apareció cerca de las británicas; las tres provenían de la misma casa de semillas, Cotswold Seed, y esta similitud puede ser debida a un antecedente común o a una hibridación.

Por otra parte, las variedades españolas mostraron una similitud genética alta, tanto con las variedades de Europa del Este como con las francesas. La esparceta originalmente cultivada en España era del tipo común y la esparceta gigante fue introducida experimentalmente en el Jardín Botánico de Madrid en 1791 (Muller 1893). Desde entonces ha habido introducciones sucesivas, la más importante fue promovida por el Ministerio de Agricultura a finales de 1960. De ahí que las esparcetas gigantes foráneas (principalmente francesas) puedan haberse mezclado con las formas nativas (Pujol 1974), dado que se estima que la esparceta es una especie alógama. Hoy en día, parte de la demanda española de semillas está cubierta por importaciones de Europa del Este. Esta situación, junto con los intercambios de semillas entre agricultores y casas de semillas, contribuye aún más a la contaminación de los ecotipos locales (Delgado *et al.* 2008). Ello se plasma en ‘Selección 1’ y ‘Selección 2’ que fueron obtenidas con la contribución de material francés y de Europa del Este. ‘Villahermosa del Rio’ fue la variedad más diferente de todas y representa, por lo tanto, una fuente interesante de variabilidad para la mejora vegetal.

Los resultados obtenidos indican que la conservación de SSR permite la amplificación inter-géneros de marcadores microsatélites desde *Medicago* y *Glycine* a *Onobrychis* y *Trifolium*. Los microsatélites transferibles seleccionados fueron útiles para la determinación de la ‘huella genética’ de las variedades de esparceta y para determinar su diversidad genética. La disponibilidad de dichos marcadores constituye una herramienta valiosa para acelerar el establecimiento de una estrategia apropiada de conservación del germoplasma, y puede contribuir al proceso de selección en el marco del desarrollo de variedades sintéticas con alto nivel de heterosis o para averiguar el nivel de pureza de las semillas en colecciones de esparceta.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich DTA (1984). Lucerne, red clover and sainfoin- herbage production. Thomson DJ. En: Forage legumes, Occasional Symposium 16, BGS, Hurley. 126-131.
- Botstein D, White RL, Skolnic M, Davis RW (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.
- Dangi RS, Lagu MD, Choudhary L, Ranjekar PK, Gupta VS (2004). Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *BMC Plant Biology* 4: 13.
- Delgado I, Salvia J, Buil I, Andrés C (2008). The agronomic variability of a collection of sainfoin accessions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 401-407.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19: 11-15.
- Eujayl I, Sledge MK, Wang L, Chekhoskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR (2004). *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago spp.* *Theoretical and Applied Genetics* 108: 414-422.
- Falahati-Anbaran M, Habashi AA, Esfahany M, Mohammadi SA, Ghareyazie B (2004). Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. *Journal of Genetics* 86: 59-63.
- Gutierrez MV, Patto MCV, Huguet T, Cubero JI, Moreno MT, Torres AM (2005). Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1210-1217.
- Hormaza JI (1999). Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. *Scientia Horticulturae* 79: 121-126.
- Muller JT (1893). *Diccionario universal de agricultura*. Ed: Elias & Co, Barcelona, España. 786 pp.
- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) Simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1275-1287.
- Peakall R, Smouse P (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pujol M (1974). *El fomento de la producción forrajero-pratense en la provincia de Huesca*. Ed: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España, 182 pp.
- Rohlf FJ (2002). NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Ed: Exeter Software, New York, USA
- Sardaro S, Molinari L, Albertini E, Rosellini D, Negri V, Falcinelli M (2003). Molecular distinctiveness of wild populations of *Poa pratensis*, *Lolium perenne* and *Onobrychis viciifolia*. *Sementi elette* 49: 47-49.
- Scott K, Egger P, Seaton G, Rosetto M, Ablett E, Lee L, Henry R (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theory of Applied Genetics* 100: 723-726.

- Sicard D, Nanni L, Porfiri O, Bulfon D, Papa R (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. & *Phaseolus coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding* 124: 464–472.
- Zhang Y, Sledge M, Bouton J (2007). Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. *Theory of Applied Genetics* 114: 1367-1378.



ANEXO II.a

**EST-SSR cross-amplification and genetic similarity in *Onobrychis* genus.**

Genetic Resources and Crop Evolution, 2010, 8 p.

# EST-SSR cross-amplification and genetic similarity in *Onobrychis* genus

Samir Demdoum · Fernando Muñoz ·  
Ignacio Delgado · José Valderrábano ·  
Ana Wunsch

Received: 27 September 2010 / Accepted: 28 February 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** EST-SSR from *Medicago truncatula* Gaertn. and *Glycine max* (L.) Merr. were tested for transferability in various species of *Onobrychis* (*O. pyrenaica* Sennen, *O. argentea* Boiss. and *O. viciifolia* Scop.). Repeatable amplification was obtained for 81% of the microsatellites and 52% were polymorphic. Six selected SSRs from *M. truncatula* were used to fingerprint and estimate the genetic similarity of a set of 23 accessions of *O. viciifolia*. PCA analysis discriminated among the different *Onobrychis* species and the sainfoin accessions were clustered in a single major group. This grouping is discussed in terms of the history of cultivation of sainfoin in Spain. The selected SSRs will allow fingerprinting and genetic studies in *Onobrychis* species, solving the lack of available SSR markers in this species.

**Keywords** Cultivar identification · Fingerprinting · Microsatellites · Molecular markers · *Onobrychis* · Sainfoin · SSR transferability

## Introduction

Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) is a traditional European fodder legume that thrives on well-drained alkaline soils in many parts of Central and Southern Europe. Cultivated sainfoin is an allotetraploid species ( $2n = 4x = 28$ , Hayot-Carbonero et al. 2010) obtained from wild botanical forms (Badoux 1965). Sainfoin domestication occurred at the end of the XVI century in the French part of the Rhine Valley. Soon, the common and giant types were selected: the first is characterized by its rusticity and persistence, the second by its higher production level and vigour (Gasparin 1846).

Despite their wide spread in Europe, a decline in the area of sainfoin, along with other temperate legumes, was mainly due to the expansion of grass production based on cheap inorganic nitrogen fertilizers in the 1970s. This intensive ruminant production system has contributed to high air and water pollution within the EU (Gill et al. 2009; Rochon et al. 2004). More recently, the move to more extensive and sustainable production systems has increased the interest for forage legumes since they offer a potential to mitigate these effects while providing local protein sources that are becoming of increasing importance in animal feeds. In this new scenario, sainfoin is appearing as a clear home-grown alternative for fodder production. Sainfoin has some anthelmintic (Hoste et al. 2006) and nutritional advantages in comparison with other forage legumes,

---

S. Demdoum (✉) · F. Muñoz · I. Delgado ·  
J. Valderrábano · A. Wunsch  
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Avda. Montañana, 930, 50059 Zaragoza, Spain  
e-mail: sdemdoum@aragon.es

most notably due to its condensed tannins content (Mueller-Harvey 2006), which may lead to a better dietary protein utilisation (Min et al. 2003), lower methane emissions and risk of bloat (Puchala et al. 2005; Ramirez-Restrepo and Barry 2005) in ruminant livestock. Agronomically, its positive characteristics include a deep taproot, that allows the plant to be very resistant to drought and of course, being a legume, there is a high level of residual fertility after sainfoin ley has been ploughed (Koivisto and Lane 2001).

While advances in plant breeding have led to improved lucerne varieties, sainfoin production has remained relying on old cultivars. Characterisation of existing germplasm seems to be necessary in order to preserve these genetic resources and provide alternative approaches for developing further breeding programmes. While morphological characterization is a necessary step in plant breeding, several molecular tools are being used to complement plant variety characterization and identification. Among these, microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) have become one of the most useful molecular marker systems in plant breeding. They are widely used in cultivar fingerprinting, genetic diversity assessment, molecular mapping, and marker assisted breeding due to their high polymorphism, repeatability and because they are codominant.

In legumes, the availability of SSRs has allowed to make progress in the characterization and assessment of the genetic diversity of species like *Medicago* (Falahati-Anbaran et al. 2004), SSR cross-species amplification has been assessed (Peakall et al. 1998) and cross-amplified SSRs have been used for genetic mapping in *Trifolium repens* (L.) (Zhang et al. 2007). While there are not microsatellites available for *O. viciifolia*, the screening of SSRs identified in *Medicago* and *Glycine* spp. offers the possibility to find similar regions on the *Onobrychis* genome that would allow a quick and reliable characterization of the sainfoin material.

Microsatellites isolation can be time and money consuming in the absence of abundant DNA sequences in a species, restricting sometimes their use to a few important agricultural crops. Still, the amount of SSRs identified is increasing at a steady pace, especially in legumes model species, and the development of SSR markers through data mining has also become an efficient and low cost option for

many plant species. An alternative approach consists in the utilization of SSR loci from related species (Smulders et al. 1997). The transferability of SSR loci often depends on genetic relatedness, and while high rates of transferability across species within the same genus (>50%) has been reported in tree species (Liewlaksaneeyanawin et al. 2004; Wünsch and Hormaza 2002) and among legumes (Eujayl et al. 2004; Gaitán-Solís et al. 2002; Peakall et al. 1998), the transferability across genera and beyond seems to be lower (Peakall et al. 1998; White and Powell 1997). On the other side, SSRs identified in ESTs (EST-SSR) markers show higher transferability rates and are expected to be more conserved than genomic SSR markers (Scott et al. 2000).

In the absence of microsatellite loci available in the genus *Onobrychis*, in this work the transferability of microsatellite markers from *Medicago* and *Glycine* to *Onobrychis* species was evaluated. A group of microsatellites were selected and these were used to provide an initial characterization of a collection of sainfoin accessions and to carry out a preliminary evaluation of the genetic diversity among them.

## Materials and methods

### Plant material and genomic DNA extraction

Twenty-three accessions of sainfoin were used in this study (Table 1), among them 12 European accessions represent the commercial material available, nine are accessions collected from seed production growers in the North-eastern part of Spain and the remaining two are selections obtained aiming respectively for persistency and for production from the CITA (Zaragoza, Spain). Two related wild species from the Pyrenees range, *O. pyrenaica* Sennen and *O. argentea* Boiss., were included to check their relatedness to *O. viciifolia* and between themselves, and *Trifolium repens* was used as an outgroup (Table 1). Additionally, *Medicago truncatula* Gaertn. and *Trifolium repens* L. accessions were used as positive controls when testing SSR transferability.

Ten plants per population were randomly selected and young healthy leaves from each plant were collected for DNA extraction. Genomic DNA was extracted using the modified (Doyle and Doyle 1987) DNA extraction protocol described by Hormaza

**Table 1** List and origin of the 27 accessions analysed in this work

Species	Accession name	Number	Origin	Provided by
<i>O. viciifolia</i>	Ambra	5	Italy	Caussade semences (Fr)
<i>O. viciifolia</i>	Cotswold common	1	United Kingdom	Cotswold seeds (UK)
<i>O. viciifolia</i>	Esparcette	3	Poland	Cotswold seeds (UK)
<i>O. viciifolia</i>	Fakir	6	France	INRA (Fr)
<i>O. viciifolia</i>	Incoronata	8	Italy	INEA Bari (It)
<i>O. viciifolia</i>	Korunga	11	Turkey	Agricultural Faculty, Izmir
<i>O. viciifolia</i>	Polonia	12	Poland	Rocalba S.A. (Spain)
<i>O. viciifolia</i>	Sepial	4	France	Caussade semences (Fr)
<i>O. viciifolia</i>	Somborne	2	United Kingdom	Cotswold seeds (UK)
<i>O. viciifolia</i>	Ukrania	7	Ukraine	Rocalba S.A. (Spain)
<i>O. viciifolia</i>	Visnovsky	9	Czech Republic	Research Inst. for Fodder Crops
<i>O. viciifolia</i>	Yubileyna	10	Bulgaria	Forage Research Inst., Pleven
<i>O. viciifolia</i>	Graus	21	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Lagueruela	17	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Loarre	18	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Mezquita	16	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Reznos	14	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Selection 1	15	Spain	Selection
<i>O. viciifolia</i>	Selection 2	13	Spain	Selection
<i>O. viciifolia</i>	Tartareu	22	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Torrecilla de Cameros	20	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Villahermosa del Río	23	Spain	Collected landrace
<i>O. viciifolia</i>	Villahoz	19	Spain	Collected landrace
<i>O. argentea</i>			Spain	Wild species, collected
<i>O. pyrenaica</i>			Spain	Wild species, collected
<i>Medicago truncatula</i>			Spain	Unspecified cultivar
<i>Trifolium repens</i>			Spain	Wild species, collected

(1999). Extracted DNA was quantified spectrophotometrically and diluted to 10 ng/ $\mu$ l before PCR amplification. For testing SSR transferability, individual DNAs were used, for variety characterization an equivalent amount of diluted DNA of the ten plants was pooled and used for SSR amplification.

#### SSR analysis

Twenty seven selected microsatellites from *Medicago truncatula* and *Glycine max* (L.) Merr. (Gutierrez et al. 2005; Peakall et al. 1998; Zhang et al. 2007) previously cross-amplified in other legume species (Gutierrez et al. 2005; Peakall et al. 1998; Zhang et al. 2007) were tested for transferability in

*O. viciifolia* (Table 2). PCR reactions were performed in 20  $\mu$ l volumes containing 20 mM Tris–HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM each dNTP, 0.2 mM each primer, 40 ng genomic DNA and 0.45 units Taq polymerase (Life Technologies, USA). Reactions were carried out on a iCycler thermocycler (BioRad, USA) using the following temperature profile: an initial step of 2 min at 94°C, 35 subsequent cycles of 45 s at 94°C, 45 s at Ta and 1 min at 72°C, and a final step of 5 min at 72°C. Ta being the annealing temperature, optimised for each SSR locus. PCR products were separated by electrophoresis using 3% ‘Metaphor’ (FMC Bioproducts) agarose gels in 1 $\times$  TBE buffer at 5 V/cm, stained with ethidium bromide and visualised under UV

**Table 2** List of microsatellites analysed in this work for transferability and polymorphism in *Onobrychis*

SSR locus	Reference (of cross-amplification)	Original species	Cross-amplification in other species	Transferability and polymorphism in <i>Onobrychis</i>
AG81	Peakall et al. (1998)	<i>G</i>	<i>V, P, L</i>	p
AW567861	Zhang et al. (2007)	<i>G</i>	<i>T</i>	p
BE608020	Zhang et al. (2007)	<i>G</i>	<i>T</i>	na
MtBA01B04R2	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p <sup>a</sup>
MtBA27D09F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p
MtBA29B03F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	np
MtBA25E01F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	np
MtBA28E09F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	np
MtBC27H11F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	na
MtBA09E01R1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	na
MtBB36F05F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p <sup>a</sup>
MtBA04C08R1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p
MtBA32A12R1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	np
MtBA37D08F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	na
MtBB36E02F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	np
MtBB22G10F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p
MtBC47B06F1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p <sup>a</sup>
MtBA02H03F3	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	np
MtBB44F02R1	Gutierrez et al. (2005)	<i>M</i>	<i>V, P, C</i>	p <sup>a</sup>
BI74	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	p <sup>a</sup>
AL79	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	p <sup>a</sup>
BG178	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	p
BE74	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	na
AW64	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	np
AL46	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	p
AW306	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	np
AW265	Zhang et al. (2007)	<i>M</i>	<i>T</i>	p

na no amplification, np not polymorphic, p polymorphic

<sup>a</sup> selected SSRs for *O. viciifolia* characterization. *Medicago truncatula* (*M*), *Glycine max* (*G*), *Vicia faba* (*V*), *Pisum sativum* (*P*), *Cicer arietinum* (*C*), *Lupinus angustifolium* (*L*), *Trifolium repens* (*T*)

light. *M. truncatula* and *T. repens* DNA was used as positive controls in the PCR reactions. Band scoring was carried out using DNA size standards (10 bp or 1 kb, Life Technologies) depending on the SSR amplification range. Those SSRs that were amplified in *Onobrychis* and that allowed a clear scoring of SSR alleles were selected for the characterization of all the accessions. Thus 6 SSRs (Table 3) were selected and evaluated in the 25 *Onobrychis* accessions and *T. repens*. All PCR amplifications were done at least twice in order to ensure the results reproducibility.

#### Data analysis

The polymorphism information content (PIC) of each of the analysed SSRs was calculated using the formula:  $PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$  (Botstein et al. 1980) where  $P_{ij}$  is the frequency of the 'ith' allele for marker 'i' in the 'jth' population and summation extends over n alleles. For the estimation of genetic similarity SSR alleles were scored as presence or absence in all the accessions and a similarity matrix was obtained from the proportion of shared fragments (Nei and Li 1979), these calculations were performed

**Table 3** Number of alleles, PIC value and range of amplification of six SSR loci analysed in 23 sainfoin populations

SSR locus	No of alleles	Range of allele size in <i>M. truncatula</i> (bp)	Range of allele size in <i>O. viciifolia</i> (bp)	PIC value
MtBA01B04R2	7	400–370	420–333	0.84
MtBB36F05F1	5	220–180	220–180	0.82
MtBC47B06F1	6	110	779–466	0.80
MtBB44F02R1	5	140–130	237–143	0.58
BI74	7	177–79	865–79	0.85
AL79	5	240	506–389	0.45
Total	35			

PIC polymorphism information content, SSR simple sequence repeat

using the NTSYS-pc 2.02 package (Rohlf 2002). To visualize differences between populations, the similarity matrix was used to run a Principal Component Analysis (PCA) in Genalex 6.1 (Peakall and Smouse 2006). Scatter plot representation was used to represent the first two Eigen values.

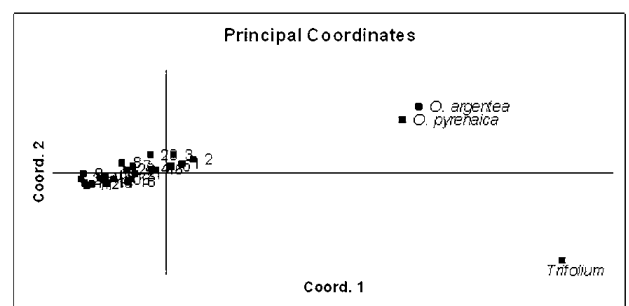
## Results

The 27 SSRs analysed were correctly amplified in *Medicago truncatula*, their original species, or in *Trifolium repens*, a species in which they had already been tested for cross-amplification (Table 2). In *Onobrychis* species, consistent amplification was obtained for 22 (81%) of the 27 microsatellites tested (Table 2) once an appropriate annealing temperature was optimised for each microsatellite. However, amplification sizes of the different SSRs were usually larger in *Onobrychis viciifolia* (79–865 bp) than that originally described in *Medicago* (79 to 240 bp).

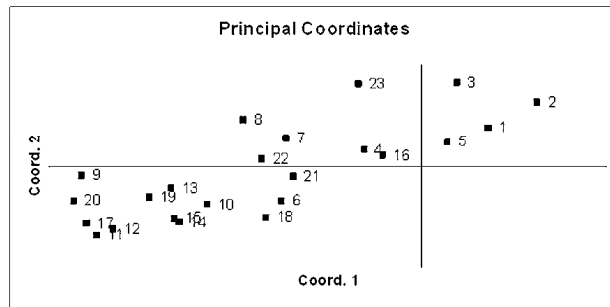
Fourteen of these 22 SSRs were polymorphic in all three *Onobrychis* species (Table 2) and six of them were selected for characterization of the sainfoin genotypes as they allowed the detection of clear bands and easy fragment recognition (Table 2). A total of 35 alleles were detected using the six microsatellites in the 25 *Onobrychis* populations. Each SSR amplified 5–7 alleles in *Onobrychis* and the average number of alleles per SSR was 5.83 (Table 3). The PIC values were calculated for each SSR on the 25 *Onobrychis* accessions (Table 3). This value ranged from 0.45 to 0.85 with the average being 0.72. Microsatellite BI74 was the SSR that revealed the higher polymorphism in the accessions tested.

While *O. viciifolia* accessions showed high genetic similarity, it was lower between *O. viciifolia* and *Onobrychis* wild species, *O. argentea* and *O. pyrenaica* (Fig. 1). These two species seemed to be closely related to each other as their similarity was almost 0.95. However, *T. repens*, was remarkably distinguished, with only a 0.23 of similarity with *Onobrychis* accessions.

The analysis of 6 SSRs in 23 populations of *O. viciifolia* and in *O. pyrenaica*, *O. argentea* and *T. repens*, produced unique fingerprints for each population, allowing the differentiation of all the 26 accessions. The first two Eigen vector of the PCA analysis explained 60.1% of the observed variation (Fig. 1). From this analysis a clear differentiation was observed between *T. repens* and all the *Onobrychis* species. Another group brought together the two wild species *O. argentea* and *O. pyrenaica*, clearly separated from *O. viciifolia* accessions and the *T. repens* genotype.



**Fig. 1** Scatter plot representing the PCA analysis on the genetic similarities among *O. pyrenaica*, *O. argentea*, *T. repens* and 23 accessions of *O. viciifolia*, based on 6 microsatellite loci (Genalex 6.1)



**Fig. 2** Scatter plot representing the PCA analysis on the genetic similarities among *O. pyrenaica*, *O. argentea*, *T. repens* and 23 accessions of *O. viciifolia*, based on 6 microsatellite loci (Genalex 6.1), zoom on *O. viciifolia* accessions

All 23 *O. viciifolia* accessions were clustered in a genetically diverse group (Fig. 2). Within these accessions ‘Cotswold common’, ‘Somborne’, ‘Esparcette’, ‘Ambra’, ‘Sepial’, ‘Mezquita de Jarque’ and ‘Villahermosa del Rio’ scattered in a large clump, that appeared to be distant from the more tightly related ‘Ukrania’, ‘Incoronata’, ‘Ambra’, ‘Selection 1’, ‘Lagueruela’, ‘Loarre’, ‘Reznos’, ‘Visnovsky’, ‘Polonia’, ‘Korunga’, ‘Yubilena’, ‘Torrecilla de Cameros’, ‘Villahoz’, ‘Selection 2’, ‘Graus’ and ‘Tartareu’. The British accessions, ‘Cotswold Common’ and ‘Somborne’, were the most genetically distant from the East European accessions like ‘Visnovsky’, ‘Polonia’ and ‘Korunga’. The French and Italian ‘Ambra’, ‘Sepial’, ‘Incoronata’ and ‘Fakir’ spread the British and East European accessions. Spanish accessions like ‘Mezquita de Jarque’, ‘Selection 1’, ‘Lagueruela’, ‘Loarre’, ‘Reznos’, ‘Torrecilla de Cameros’, ‘Villahoz’, ‘Selection 2’, ‘Graus’ and ‘Tartareu’. were distributed among French, Italian and East European accessions.

## Discussion

In order to characterize and evaluate the genetic diversity of cultivated sainfoin, microsatellite loci derived from related legume species were evaluated for transferability in *O. viciifolia* and the wild species *O. argentea* and *O. pyrenaica*. Transferable SSR loci were selected on the basis of polymorphism and reproducibility and these were used for the characterization and genetic similarity evaluation of 23 sainfoin accessions.

## Cross-genus transferability

The proportion of microsatellites transferable between *Medicago* and *Onobrychis* (81%) was higher than data previously reported for cross-genus amplification. Intra-genus amplification was usually around 50% (Eujayl et al. 2004; Peakall et al. 1998) and declined quickly when reaching out the genus. Zhang et al. (2007) found 18–22% of transferability from *Medicago* to *Trifolium*, but Peakall et al. (1998) reported only 1–3% of transferability of *Glycine*’s SSR among other legumes genus. In this work, EST-SSR were used and these are expected to be more conserved than genomic SSR (Peakall et al. 1998; Scott et al. 2000). Additionally, the SSR loci assayed for transferability had already been shown to be conserved among different genera. Thus the high level of transferability detected here indicates that selecting cross-conserved SSR for transferability across new species is a good strategy for the identification of transferable SSR in a new species. In spite of the conserved nature of the EST-SSRs, which may limit their polymorphism, a high proportion of microsatellites were found to be polymorphic in *Onobrychis* (63% of transferable SSRs). Six of these were used for the analysis and showed high PIC values (average 0.72) indicating their usefulness for molecular studies in *O. viciifolia*.

The number of allele per locus observed in *Onobrychis* ranged from 5 to 7, which is slightly lower than previously reported in lucerne (4–14) (Falahati-Anbaran et al. 2004). Since *Onobrychis* is a tetraploid species and accessions were analysed in bulks of 10 individuals the number of alleles detected seem to be low. This could be caused for various reasons. First the detection method used, agarose electrophoresis, is not sensitive enough to differentiate alleles with small size differences and it may not be scoring alleles that are being amplified. Nevertheless, working with a tetraploid species, an initial evaluation of the accessions by horizontal electrophoresis allows the visualization of the amplified loci and facilitates a preliminary evaluation of the markers. Otherwise more sensitive detection methods like capillary electrophoresis would provide fragment patterns even more difficult to score due to the stutter of the markers. On the other hand, the bulking of DNA samples and their co-amplification by PCR cause less frequent alleles to be lost and only most common

alleles to be detected. This may cause that a number of alleles present in the population could not be detected, leading therefore to an under estimation of the number of alleles detected per loci in each population.

In various SSR (like MtBC47B06F1 and MtBB44F02R1) various loci seemed to be amplified. The generation of multiple products during cross-species amplification may occur by mutation, rearrangements and duplications in the flanking region and/or changes in the number of repeats (Peakall et al. 1998), as reported by Gutierrez et al. (2005) using EST-SSR in legumes.

### Genetic similarity

The level of polymorphism shown by the six microsatellites selected made it possible to produce a unique fingerprint of each population. The PCA analysis based on the coefficient of similarity differentiated all *O. viciifolia* accessions from *T. repens* and from *O. argentea* and *O. pyrenaica* wild species, that were highly similar amongst themselves. This is surprising because morphologically *O. argentea* is more similar to *O. viciifolia* than to *O. pyrenaica*.

All sainfoin varieties shared a similarity coefficient above 0.80, matching results from Sardaro et al. (2003) that reported by ALFP a similarity level of 0.73 among sainfoin accession using AFLP analysis. The high similarity found among *O. viciifolia* accession suggested that they were more closely related between themselves than varieties of *Trigonella foenum-graecum* L. (0.66, Dangi et al. 2004) or *Phaseolus coccineus* L. or *vulgaris* L. (0.6 and 0.75, Sicard et al. 2005) which are more ancient domesticated legume crops.

The distribution of the *O. viciifolia* genotypes in the PCA analysis was in relation with the geographic distribution of these accessions, with the British accessions more distant from the rest, East Europeans clustered together and distant from the British ones, and French and Italian accessions in between these two groups. The British cultivars ‘Cotswold Common’ and ‘Somborne’, were clearly differentiated from the other material and this was probably caused by the isolation of British germplasm and low seed exchanges with the rest of the continent from early 1980 s (Aldrich 1984). Only East European accession ‘Espacelette’ from Poland, appeared closer to the British accessions, and was provided by the same

seed producer, Cotswold Seeds, and this similarity may be due to common ancestry or hybridisation.

On the other side, Spanish accessions showed a high genetic similarity with both East European and French accessions. Sainfoin originally sown in Spain was the “common” type and giant sainfoin was introduced experimentally by the Botanical Gardens of Madrid in 1791 (Muller 1893). Since then there have been successive introductions, the most important being promoted by the Ministry of Agriculture at the end of the 1960 s. Thus, foreign giant sainfoins (mainly introduced from France) could have mixed with native forms (Pujol 1974) given that sainfoin is thought to be an allogamous species. Nowadays, part of the seed demand is met with imports from Eastern Europe countries. This situation together with seed transfer between farmers and commercial enterprises is contributing further to the contamination of local ecotypes (Delgado et al. 2008). This is particularly true for “Selection 1” and ‘Selection 2’ which were obtained from French and East European material. ‘Villahermosa del Rio’ was found to be the most distinct accession of all and therefore represent an interesting source of variability for breeding purposes.

The results obtained indicate that conservation of SSR allows successful cross-genus amplification of *Medicago* and *Glycine* microsatellite markers in *Onobrychis* and *Trifolium*, which belong to the same family (Leguminosae) but different genera. Transferable selected microsatellites were useful to fingerprint *Onobrychis* accessions and to estimate their genetic diversity. The availability of these markers will be useful to accelerate the implementation of appropriate germplasm conservation strategies, to assist in the selection process for development of synthetic varieties with high level of heterosis or to assess seed purity in sainfoin collections.

**Acknowledgments** We gratefully acknowledge T. Bespín, A. M. Cachi, S. Sancho and M. E. Guerra for technical assistance; Dr F. Fillat for expert advices in collecting wild species. This work has been partly supported by the Marie Curie Actions Project no MRTN-CT-2006-035805 and by the DGA Grupo de Excelencia A-11.

### References

- Aldrich DTA (1984) Lucerne, red clover and sainfoin—herbage production. In: Thomson DJ (ed) Forage legumes, occasional symposium 16, BGS, Hurley, pp 126–131



- Badoux S (1965) Étude des caractères morphologiques physiologiques et agronomiques de populations d'espèces (*Onobrychis* spp.). Rech Agron Suisse 4:111–190
- Botstein D, White RL, Skolnic M, Davis RW (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314–331
- Dangi RS, Lagu MD, Choudhary L, Ranjekar PK, Gupta VS (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biol 4:13
- Delgado I, Salvia J, Buil I, Andrés C (2008) The agronomic variability of a collection of sainfoin accessions. Span J Agric Res 6:401–407
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11–15
- Eujayl I, Sledge MK, Wang L, Chekhoskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. Theor Appl Genet 108:414–422
- Falahati-Anbaran M, Habashi AA, Esfahany M, Mohammadi SA, Ghareyazie B (2004) Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. J Genet 86:59–63
- Gaitán-Solís E, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002) Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. Crop Sci 42:2128–2136
- Gasparin A (1846) Cours d'agriculture. Librairie Agricole de la Maison Rustique IV, Paris, p 780
- Gill M, Smith P, Wilkinson JM (2009) Mitigating climate change: the role of domestic livestock. Animal 4:323–333
- Gutierrez MV, Patto MCV, Huguet T, Cubero JJ, Moreno MT, Torres AM (2005) Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. Theor Appl Genet 110:1210–1217
- Hayot-Carbonero C, Mueller-Harvey I, Brown TA, Smith L (2010) Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. Plant Genet Res (In press)
- Hormaza JI (1999) Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. Sci Hortic 79:121–126
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg S, Hoskin SO (2006) The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol 22:253–261
- Koivisto JM, Lane GPF (2001) Sainfoin, worth another look. FAO, <http://www.fao.org/ag/AGP/doc/Gbase>
- Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K (2004) Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. Theor Appl Genet 109:361–369
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Anim Feed Sci Technol 106:3–19
- Mueller-Harvey I (2006) Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. J Sci Food Agric 86:2010–2037
- Muller JT (1893) Diccionario universal de agricultura. Elias & Co, Barcelona, p 786
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 76:5269–5273
- Peakall R, Smouse P (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288–295
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998) Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) Simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. Mol Biol Evol 15:1275–1287
- Puchala R, Min BR, Goetsch AL, Sahlu T (2005) The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. J Anim Sci 83:182–186
- Pujol M (ed) (1974) El fomento de la producción forrajero-pratense en la provincia de Huesca. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain, p 182
- Ramirez-Restrepo CA, Barry TN (2005) Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. Anim Feed Sci Technol 120:179–201
- Rochon JJ, Doyle CJ, Greef JM, Hopkins A, Molle G, Sitzia M, Scholefield D, Smith CJ (2004) Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. Grass Forage Sci 59:197–214
- Rohlf FJ (2002) NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software, New York
- Sardaro S, Molinari L, Albertini E, Rosellini D, Negri V, Falcinelli M (2003) Molecular distinctiveness of wild populations of *Poa pratensis*, *Lolium perenne* and *Onobrychis viciifolia*. Sementi elette 49:47–49
- Scott KD, Egger P, Seaton G, Rosetto M, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2000) Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor Appl Genet 100:723–726
- Sicard D, Nanni L, Porfiri O, Bulfon D, Papa R (2005) Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. & *Phaseolus coccineus* L. landraces in central Italy. Plant Breed 124:464–472
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B (1997) Use of short microsatellites to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor Appl Genet 94:264–272
- White G, Powell W (1997) Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. Mol Ecol 6:1195–1197
- Wünsch A, Hormaza JI (2002) Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. Heredity 89:56–63
- Zhang Y, Sledge MK, Bouton JH (2007) Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. Theor Appl Genet 114:1367–1378

## ANEXO II.b

### Protocolo de extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído de 252 genotipos de esparceta, cultivados y silvestres, de *Medicago truncatula* y *Trifolium repens* (Tabla II.1, Ensayo II), perteneciente al CITA, Zaragoza, utilizando una versión modificada (Hormaza, 2002) del protocolo de extracción de ADN descrito por Doyle y Doyle (1987). Se utilizaron hojas jóvenes recogidas en primavera (0,5g) que fueron trituradas en 400 µl tampón de extracción (100mM Tris HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP, 0.1% bisulfito de sodio) y mezcladas posteriormente con 0,4 µl de 2-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas durante 25 minutos a 65°C y posteriormente se mezclaron con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante fue separado después de la centrifugación y los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 240 µl de isopropanol frío. El precipitado fue recuperado mediante un centrifugado a 13.000 g durante 5 minutos, lavado en 400 µl de tampón de lavado (10mM acetato de amonio en etanol al 76%), secado durante una noche y resuspendido en tampón MTE (10mM Tris HCl, 0,1mM EDTA). El ADN extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría y diluido a una concentración de 10 ng/µl antes de su amplificación mediante PCR.





## **Ensayo III: Efecto del ritmo de corte sobre el rendimiento, la composición química del forraje y la dinámica de reservas radiculares en dos variedades de esparceta**

### **I. OBJETIVOS**

Este ensayo trata de determinar el efecto de tres ritmos de corte contrastados sobre el rendimiento y la composición química del forraje, así como su influencia sobre el estado de las reservas radiculares, en dos variedades representativas de los dos tipos de esparceta; “uno y dos cortes”. Los parámetros estudiados se complementan con una descripción morfológica de la planta en el momento de su evaluación.

Ello se ha llevado a cabo mediante:

1. La caracterización morfológica de las plantas, incluyendo la separación de hojas y tallos
2. La cuantificación del rendimiento en materia seca del forraje en cada corte y tratamiento (ritmo de corte)
3. La evaluación de los parámetros de calidad nutritiva (proteína bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, lignina ácido detergente y taninos condensados) del forraje
4. La determinación de los contenidos en almidón, azúcares y proteína bruta de la raíz y corona

### **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **II.1 Localización y condiciones físicas del ensayo**

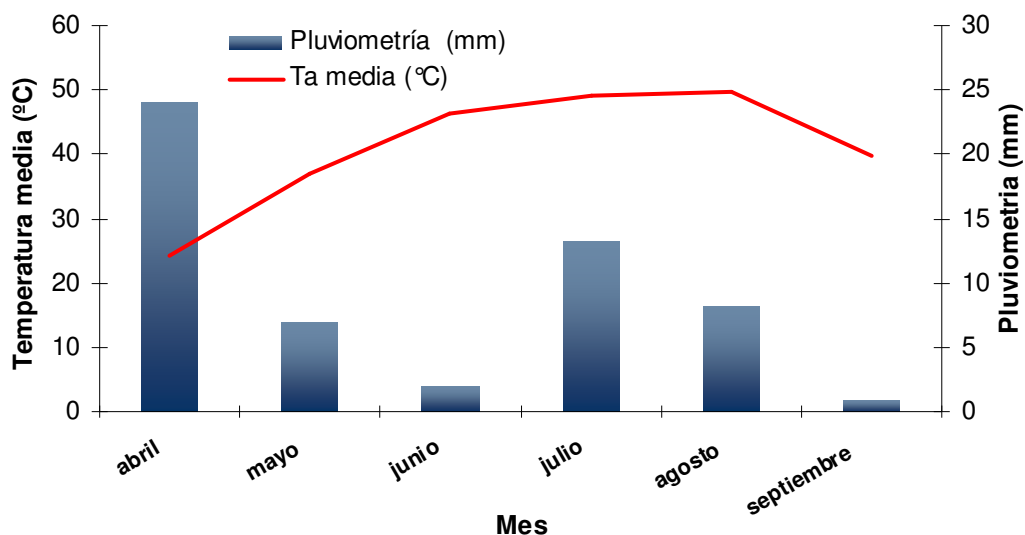
El ensayo se localizó en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), sito en Zaragoza (41°3'N; 0°47'W; altitud 225 m), durante el periodo 2008-2009. Se utilizaron para ello contenedores de 50 l de capacidad (42 cm de diámetro por 90 cm de altura), con el fin de facilitar la recuperación completa del sistema radicular.

Los contenedores se rellenaron con tierra de un suelo aluvial, cuyas características granulométricas y de fertilidad fueron: textura franco-arenosa, pH 8,2, no salino y fertilidad media (**Tabla II.1**). Previamente al llenado, los contenedores se acondicionaron en la base con un drenaje de 8 cm de grava y, una vez rellenos, se completaron con una capa de tierra procedente de un campo de esparceta, con el fin de proveer las rizobacterias necesarias para la nodulación.

**Tabla II.1.** Análisis de granulometría y fertilidad del suelo

Determinaciones	Método	Unidad	Resultado	
<b>Textura (criterio U.S.D.A.)</b>				
Arena total (0,05-2 mm)	Sedimentación	% p/p	53,115	
Limo grueso (0,02-0,05 mm)	Sedimentación	% p/p	23,755	
Limo fino (0,002-0,02 mm)	Sedimentación	% p/p	16,395	
Arcilla (<0,002 mm)	Sedimentación	% p/p	6,735	
<b>Fertilidad</b>				
pH al agua 1:2,5	Potenciometría		8,215	(+/-) 0,1
Prueba previa de salinidad (C.E. 1:5)	Oficial	dS/m	0,18	0,001
Materia orgánica por espectroscopia	Oficial	% p/p	2,075	0,04
Fósforo Olsen por espectroscopia UV/V	Oficial	mg/kg	13,715	0,93
Potasio (extracto acetato amónico)	Abs. Atómica	mg/kg	60	
<b>Cationes de cambio</b>				
Magnesio	Abs. Atómica	meq/100 g	0,915	

Las características climatológicas en las que se ubicó el ensayo corresponden a un clima de tipo mediterráneo subhúmedo; las temperaturas medias mensuales, así como la precipitación acumulada mensualmente durante el periodo de ensayos, abril a septiembre de 2009, se muestran en la **Figura II.1**. La precipitación media mensual osciló entre 1,8 mm y 48,2 mm; la temperatura media mínima fue en abril con 12,1 °C y la temperatura media máxima en agosto, con 24,8 °C. Los datos climatológicos se obtuvieron de la estación climática ubicada en la propia finca.



**Figura II.1:** Temperaturas medias y pluviosidad mensual durante el periodo del ensayo (2009) en el observatorio meteorológico del CITA en Zaragoza.

## II.2. Material vegetal e implantación

En función de los resultados provisionales obtenidos en el Ensayo I, se seleccionaron las dos variedades de esparceta que mejor representaban a las variedades de uno y dos cortes dentro de una colección de 23 variedades. Según este criterio y por su gran homogeneidad intravarietal, se seleccionaron las variedades ‘Cotswold Common’, del tipo “un corte” procedente de Inglaterra y ‘Reznos’, del tipo “dos cortes” oriunda de Soria. En la **Figura II.2** se puede apreciar la mayor intensidad de floración en el año de establecimiento de ‘Reznos’, como corresponde al tipo de dos cortes, en comparación con ‘Cotswold Common’.

La siembra se realizó el 11/03/08 en alveolos individuales 5\*5\*10 cm de tamaño, a razón de una semilla por alveolo, rellenos con una mezcla de arena, turba y tierra de cultivo a partes iguales, puestos en un invernadero. El 27/03/08, las plantas que presentaban al menos tres hojas multifoliadas, se transplantaron a los contenedores. Se establecieron 12 plantas por contenedor, lo que corresponde a la densidad de cultivo de 120 plantas por m<sup>2</sup>.



**Figura II.2.** Vista de dos toneles de las variedades ‘Reznos’ (florida) y ‘Cotswold Common’ (en estado vegetativo) en el año de establecimiento (2008).

### II.3. Diseño experimental

Las plantas se sometieron a tres intensidades de corte distintas, definidas por el estado fenológico, dado que la fenología de las plantas refleja el estado fisiológico de éstas de manera más fiel que su altura o la duración entre cortes. Las intensidades de corte utilizadas fueron inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF), definidas según la escala propuesta por Delgado *et al.* (2010b) y que se muestran en la Figura II.3:

- Estado IF. Al menos dos-tres inflorescencias por planta con dos-tres flores abiertas en la parte inferior de la inflorescencia
- Estado PF. Al menos dos-tres inflorescencias por planta con el 50% de las flores abiertas en la parte media de la inflorescencia
- Estado FF. Al menos dos-tres inflorescencias por planta con flores abiertas en la parte superior

Los contenedores se distribuyeron según un diseño estadístico de parcelas divididas con tres repeticiones, donde las parcelas principales correspondían a las variedades y las subparcelas a las intensidades de corte.



**Figura II.3.** Estados fenológicos de la esparceta: inicio, plena y final de floración

#### II.3.1 Manejo del ensayo

Durante la duración del ensayo, no se aportó fertilización alguna ni se realizaron tratamientos fitosanitarios; las malas hierbas se eliminaron manualmente. Los contenedores se regaron por goteo, en función de las condiciones climáticas, siendo la dosis media de 4 l por contenedor, aplicada dos veces a la semana durante el periodo de primavera-verano. Las paredes externas de los contenedores se protegieron con pacas de paja para evitar su calentamiento por el sol.



En el año de establecimiento (2008) se efectuaron cinco cortes, en la misma fecha para las dos variedades, con el fin de facilitar su implantación.

En el periodo de ensayos propiamente dicho, abril-septiembre 2009, las plantas se cortaron según los tratamientos establecidos. Se efectuaron en total seis cortes en el tratamiento IF, cinco cortes en el PF y cuatro cortes en el FF. Todos los contenedores de un tratamiento se segaron a la vez; la siega se efectuó con tijeras eléctricas a una altura de 5 cm del suelo.

En cada corte se retiraron y vaciaron tres contenedores. Seguidamente, se extrajeron las 12 plantas de cada contenedor, se lavaron con agua fría para quitar los restos de tierra de la corona y raíces; a continuación se dejaron secar sobre papel absorbente antes de su evaluación. El contenido de cada contenedor vaciado se identificó según su tratamiento y orden, *i.e.* IF3 corresponde a ‘corte en inicio de floración’, tercer corte del tratamiento.

### **II.3.2 Parámetros agromorfológicos**

En las plantas procedentes de cada contenedor se evaluaron los siguientes parámetros: longitud y peso de la parte aérea, número de tallos y de inflorescencias, proporción de hojas, número de foliolos, peso de la corona, y longitud, diámetro y peso de la raíz. Estos parámetros se determinaron sobre las 12 plantas salvo para la proporción de hojas, que se determinó sobre tres plantas elegidas al azar. Después se realizó el promedio de los resultados de las 12 plantas (o de las 3 plantas para la proporción de hojas), considerando el contenedor la repetición (**Figura II.3.2**)

#### **II.3.2.1 Longitud de la parte aérea**

La longitud de la parte aérea se definió como la longitud en cm medida desde la corona al ápice medio de los tres tallos más largos.

#### **II.3.2.2 Peso de la parte aérea**

Se obtuvo a partir del peso fresco corregido por la proporción de materia seca (MS). La proporción de MS fue obtenida a partir de tres plantas, elegidas al azar, desecadas en estufa a 103 °C hasta peso constante. El peso total de la parte aérea se obtuvo sumando el peso de la parte aérea producido en todos cortes por cada tratamiento y variedad.

#### **II.3.2.3 Número de tallos**

Se determinó como el número de tallos emitidos a partir la corona y provistos de tres hojas al menos.

#### **II.3.2.4 Número de inflorescencias**

Se definió como el número de inflorescencias visibles por planta, sin mención de su estado de desarrollo.

#### **II.3.2.5 Proporción de hojas**

Se estableció como el ratio entre el peso seco de las hojas (foliolos y pecíolos) y el peso seco de la parte aérea de la planta (hojas, tallos y restos)

#### **II.3.2.6 Número de foliolos**

Se obtuvo por conteo de los foliolos de la quinta hoja a partir del ápice de un tallo representativo de cada planta.

### II.3.2.7 Peso de la corona

Se obtuvo a partir del peso fresco, corregido por la proporción de MS. Ésta se determinó según el procedimiento descrito en el apartado II.3.2.2. La corona incluía la inserción de la raíz y de los tallos y algunos restos de pecíolos marchitos.

### II.3.2.8 Longitud de la raíz

Se determinó como la longitud en cm de la raíz pivotante, desde la corona a su conclusión.

### II.3.2.9 Diámetro de la raíz

El diámetro de la raíz se midió en mm con un calibre digital sobre la raíz pivotante justo por debajo de la corona.

### II.3.2.10 Peso de la raíz

Se obtuvo a partir del peso fresco de la totalidad del sistema radicular extraído, corregido por la proporción de MS. Esta se determinó según el procedimiento descrito en el apartado II.3.2.2.



**Figura II.3.2.** Vista de un contenedor volcado, de las plantas lavadas y de las muestras embolsadas.

## II.3.3 Determinaciones analíticas

La parte aérea, coronas y raíz de las plantas de cada contenedor, salvo las tres empleadas para la determinación de la MS, se agruparon en tres bolsas distintas según el tipo de material y se congelaron a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente se liofilizaron y se molieron a un tamaño de partícula de 1mm. Las determinaciones químicas utilizadas para la caracterización nutritiva de las muestras fueron las siguientes:

### II.3.3.1 Proteína bruta (PB)

La determinación del nitrógeno se realizó sobre muestras de la parte aérea, coronas y raíces mediante el método Dumas de pirólisis completa de la muestra y medición por conductividad térmica del contenido de nitrógeno de los gases de combustión. Para calcular su contenido en PB se multiplicó el contenido del nitrógeno Dumas por el factor 6,25 (Helrick 1990).

### **II.3.3.2 Fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD)**

Estos conceptos definidos por Goering y Van Soest (1970), se basan en la separación de los hidratos de carbono estructurales de la célula de acuerdo con la disponibilidad nutritiva de los mismos. Estas determinaciones se realizaron sobre muestras de la parte aérea.

#### **II.3.3.2.1 FND**

La FND se define como la fracción del alimento insoluble en una solución del detergente sulfato de lauril-sodio tamponada a  $\text{pH}=7,0\pm 0,1$ , tras ebullición suave durante 1 hora (Van Soest *et al.* 1991). El concepto FND se considera como sinónimo de pared celular excepto pectinas, que son solubilizadas casi por completo en dicha solución.

#### **II.3.3.2.2 FAD**

La FAD es la proporción de alimento insoluble en caliente en una solución del detergente bromuro de trimetil-cetil-amonio en ácido sulfúrico 1N tras ebullición suave durante 1 hora (Van Soest *et al.* 1991). Representa la fracción de celulosa y lignina, aunque se ha comprobado que también contiene la fracción de cutinas.

La diferencia entre NDF y ADF, expresadas libres de cenizas, proporciona una estimación del contenido en hemicelulosa de la muestra.

#### **I.3.3.2.3 LAD**

La LAD se determinó mediante la digestión de la muestra en ácido sulfúrico 72% (Goering y Van Soest 1970). El resultado es una estimación del contenido en lignina de la muestra. La diferencia entre ADF y ADL es una estimación del contenido en celulosa de la muestra. El contenido en cenizas proporciona una estimación de la cantidad de minerales y cutina presentes en la muestra.

### **II.3.3.3 Carbohidratos no estructurales**

La determinación de la cantidad de carbohidratos no estructurales se realizó sobre muestras de raíces y coronas mediante un análisis en dos etapas, en las cuales, azúcares y almidones fueron determinados secuencialmente según el método fenol-ácido sulfúrico propuesto por Dubois *et al.* (1956) y modificado por Buysse y Merxk (1993).

### **II.3.3.4 Taninos condensados (TC)**

Los TC son unos compuestos de importancia en la esparceta, ya que se les atribuye parte de las cualidades nutritivas y antihelmínticas del forraje. El contenido en TC se determinó mediante el test de HCL-butanol descrito por Porter (1989), que consiste en una hidrólisis ácida de los TC en monómeros llevando a cambios de color, lo que permite su determinación por espectrofotometría visible (490 nm, espectrofotómetro Heλios β, Thermo electron corporative, Inglaterra 2000). La determinación de los TC se realizó sobre las muestras de la parte aérea.

La determinación de los contenidos en FND, FAD, LAD, TC, AL y AZ se realizó mediante la utilización de la técnica de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

### II.3.3.5 Ecuaciones de calibración NIRS para la determinación de la composición química de las muestras

Se utilizó el método de mínimos cuadrados parciales modificado (Shenk y Westerhaus 1991). Los modelos obtenidos fueron validados mediante un proceso de validación cruzada. Las características de las ecuaciones de calibración para las distintas determinaciones analíticas se resumen en la **Tabla II.3.3**.

**Tabla II.3.3.** Términos estadísticos de las ecuaciones de calibración NIR y de la validación cruzada utilizadas en la predicción de la composición química de la materia seca de las muestras de parte aérea, corona y raíz del ensayo.

		Nº	SEC	R2C	SECV	R2CV
Parte aérea	FND	65	1,61	0,96	2,18	0,92
	FAD	65	1,36	0,95	1,84	0,91
	LAD	65	0,50	0,95	0,66	0,92
	TC	59	0,30	0,87	0,37	0,81
Corona	AL	137	0,73	0,87	0,83	0,84
	AZ	140	0,56	0,84	0,62	0,81
Raíz	AL	73	1,11	0,81	1,34	0,72
	AZ	67	0,53	0,82	0,59	0,78

N = Nº de muestras utilizadas en el proceso de calibración; SEC = error estándar de las muestras del grupo de calibración; R<sup>2</sup>C= coeficiente de determinación de calibración; SECV = error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup>CV = coeficiente de determinación de validación cruzada.

## II.4 Análisis estadísticos

### II.4.1 Análisis de la varianza

El análisis de la varianza se llevó a cabo en base a un modelo en parcelas divididas con los siguientes factores:

- Factor ‘tratamiento’ o ritmo de corte: se trata de un factor fijo.
- Factor ‘corte’ (rango del corte): se trata de un factor fijo jerarquizado al tratamiento.
- Factor ‘variedad’: considerado como fijo.
- Efecto bloque: se consideró como efecto aleatorio.

Descripción del modelo:

$$\gamma_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + V_k + (V*T)_{ij} + \epsilon_{1\ ij} + C(T)_l + [V*C(T)]_{kl} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde T = tratamiento, B = bloque, V = variedad y C = corte.

Para el peso total de la parte aérea, el modelo empleado fue el siguiente:

$$\gamma_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + \epsilon_{1\ ij} + V_k + (V*T)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

Los valores en porcentaje (proporción de hojas, valores de determinaciones químicas) fueron transformados por arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis estadístico y los valores de conteos por logaritmo más 1. Se comprobó la normalidad de los datos y de los residuos mediante un test de Shapiro-Wilk.

El análisis de la varianza se realizó mediante el procedimiento ‘proc mixed’ del paquete estadístico SAS (SAS 2004).

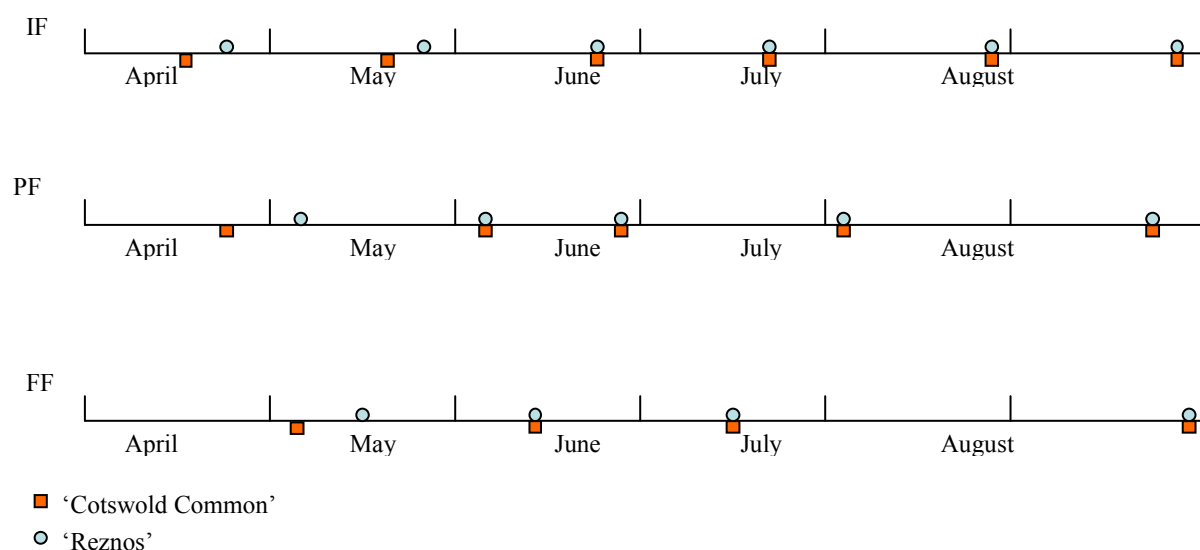
### III RESULTADOS

#### III.1 Parámetros agromorfológicos

En las **Tablas III.1.a** y **III.1.b**, se recogen los resultados medios y la desviación típica de los diferentes parámetros agromorfológicos analizados para cada variedad, tratamiento y corte. En la **Tabla III.1.a**, se presentan los correspondientes a longitud y peso de la parte aérea, número de tallos, número de inflorescencias y proporción de hojas, y en la **Tabla III.b**, número de folíolos, peso de la corona y longitud, diámetro y peso de la raíz.

En la **Tabla III.1.c** se resumen los valores medios correspondientes a los diferentes ritmos de corte y a cada variedad, así como la significación de los efectos para cada factor obtenidos en el análisis de la varianza.

En la **Figura III.1** se muestran gráficamente las fechas de los cortes realizados durante 2009. Se practicaron en total seis cortes en IF, cinco en PF y cuatro en FF. ‘Cotswold Common’ fue más precoz en el primer corte alcanzando el estado de IF, PF y FF con 4, 14 y 10 días de antelación con respecto a ‘Reznos’. ‘Cotswold Common’ fue también más precoz en IF2. En los restantes cortes ambas variedades se solaparon, debido a que el crecimiento se ralentizó y la floración en verano fue escasa e irregular, llegando incluso a desaparecer en IF, PF5 y FF4. El tratamiento IF equivalió prácticamente a un corte al mes (transcurrió de 29 a 34 días entre cortes), mientras que los tratamientos PF y FF se dilataron en verano esperando una mayor presencia de flores.



**Figura III.1.** Fechas de corte en IF, PF y FF de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en IF, PF y FF, durante 2009.

**Tabla III.1.a** Longitud (cm) y peso de la parte aérea (g/planta), número de tallos, número de inflorescencias y proporción de hojas (%) en dos variedades (Var) de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R) en los diferentes cortes practicados en inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF) en 2009 (DE, desviación estándar). Media de tres repeticiones (doce plantas/repeticion y 3 plantas/repeticion para la determinación de proporción de hojas).

Trat	Corte	Var	Longitud de la parte aérea		Peso de la parte aérea		Número de tallos		Número de inflorescencias		Proporción de hojas	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
IF	1	C	53,3	3,4	16,9	2,2	10,1	1,4	13,3	1,4	0,4	0,0
IF	1	R	64,8	1,5	13,0	1,2	6,5	0,2	6,8	1,4	0,3	0,0
IF	2	C	23,6	5,2	6,0	1,7	8,7	0,5	9,9	1,4	0,4	0,0
IF	2	R	41,4	1,2	5,4	0,7	4,7	0,1	6,4	1,8	0,3	0,0
IF	3	C	17,9	1,3	3,3	0,9	4,5	1,1	0,0	1,4	0,6	0,1
IF	3	R	32,9	9,2	3,9	1,0	3,9	0,9	4,7	1,4	0,4	0,0
IF	4	C	17,6	4,4	3,3	1,1	4,9	1,2	0,0	1,4	0,4	0,2
IF	4	R	26,0	0,8	3,8	1,5	5,3	0,3	2,5	1,4	0,6	0,1
IF	5	C	15,9	2,9	3,4	1,4	6,7	2,2	0,0	1,4	0,6	0,0
IF	5	R	24,8	3,6	4,0	0,8	5,2	0,4	1,2	1,4	0,6	0,0
IF	6	C	17,3	0,6	2,7	0,4	5,9	0,6	0,0	1,4	0,6	0,1
IF	6	R	18,4	2,9	4,4	0,6	7,8	0,9	0,0	1,4	0,6	0,1
PF	1	C	52,5	3,0	10,5	1,4	7,9	0,9	12,2	1,4	0,4	0,1
PF	1	R	68,6	3,8	9,8	2,0	5,7	0,8	7,0	1,4	0,4	0,1
PF	2	C	22,6	2,6	4,6	0,4	5,6	0,3	3,3	1,4	0,4	0,2
PF	2	R	33,0	3,7	4,7	0,6	3,9	0,3	4,3	1,4	0,3	0,2
PF	3	C	16,4	0,8	3,8	0,5	8,0	1,2	0,0	1,4	0,5	0,1
PF	3	R	33,9	2,2	6,7	1,1	6,3	1,3	6,2	1,4	0,3	0,1
PF	4	C	17,9	0,6	4,4	0,9	6,4	0,5	0,0	1,4	0,6	0,1
PF	4	R	30,1	4,3	4,7	1,3	5,1	0,0	1,8	1,4	0,5	0,0
PF	5	C	20,9	1,6	4,5	1,7	9,4	1,4	0,0	1,4	0,7	0,0
PF	5	R	20,3	3,5	5,5	1,3	8,2	1,0	0,0	1,4	0,6	0,2
FF	1	C	53,1	4,9	14,3	3,3	6,4	0,3	11,3	1,4	0,3	0,0
FF	1	R	61,8	1,8	12,4	1,6	6,3	0,2	8,9	1,4	0,3	0,0
FF	2	C	22,4	2,5	5,4	1,3	8,9	0,6	2,1	1,4	0,4	0,1
FF	2	R	35,4	4,0	7,3	0,6	6,3	0,8	5,7	1,4	0,4	0,1
FF	3	C	20,4	2,0	4,2	0,8	9,5	4,7	0,0	1,4	0,5	0,1
FF	3	R	26,6	10,3	8,0	6,5	6,2	2,4	5,5	1,4	0,3	0,0
FF	4	C	19,2	2,3	6,8	1,8	9,6	1,1	0,0	1,4	0,5	0,0
FF	4	R	30,6	1,9	5,2	0,5	6,3	0,3	1,8	1,4	0,5	0,1

**Tabla III.1.b** Número de foliolos, peso de la corona (g/planta), longitud (cm), diámetro (mm) y peso de la raíz (g/planta) en dos variedades (Var) de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R) en los diferentes cortes practicados en inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF) en 2009 (DE, desviación estándar). Media de tres repeticiones (doce plantas/repeticion y una planta/repeticion para el número de foliolos).

Trat	Corte	Var	Número de foliolos		Peso de la corona		Longitud de la raíz		Diámetro de la raíz		Peso de la raíz	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
IF	1	C	23,2	1,2	6,3	1,4	12,7	1,0	7,9	0,7	5,0	0,6
IF	1	R	22,7	0,6	7,5	1,4	10,1	0,6	8,4	1,1	4,6	0,4
IF	2	C	20,1	0,2	4,2	0,7	12,7	1,5	7,5	0,3	5,9	0,4
IF	2	R	17,1	0,6	6,6	2,4	8,1	0,9	7,9	0,8	6,6	0,5
IF	3	C	19,2	3,7	5,0	1,0	12,0	1,4	8,8	1,3	6,0	0,6
IF	3	R	14,4	3,2	6,4	2,8	16,7	5,3	9,8	1,5	5,4	0,4
IF	4	C	17,9	1,1	4,9	0,2	13,0	0,4	8,6	.	4,9	0,3
IF	4	R	14,4	1,2	6,5	0,8	18,9	1,3	10,5	1,4	5,9	0,5
IF	5	C	18,9	2,1	5,3	0,9	14,7	0,2	8,9	0,8	5,7	0,8
IF	5	R	12,1	0,4	5,7	0,7	14,7	2,0	8,9	0,8	4,8	0,3
IF	6	C	18,1	0,4	4,7	1,1	15,0	1,0	8,0	0,0	5,6	0,2
IF	6	R	14,7	2,0	7,3	1,5	14,5	3,4	8,6	0,7	6,6	0,8
PF	1	C	24,9	1,2	4,9	2,5	13,5	2,6	7,3	0,2	4,8	0,7
PF	1	R	22,6	0,8	7,8	1,8	13,9	0,8	9,1	2,0	5,1	0,8
PF	2	C	17,7	0,3	3,9	0,9	12,9	1,2	7,8	0,5	4,2	0,1
PF	2	R	16,7	0,5	3,9	0,1	10,4	0,9	10,1	0,6	5,3	0,6
PF	3	C	16,5	1,8	2,6	0,2	10,0	3,1	8,0	0,3	4,7	0,3
PF	3	R	13,7	1,8	3,8	0,7	14,0	1,4	10,4	0,2	6,4	0,3
PF	4	C	17,1	0,5	5,4	1,0	14,9	0,3	8,9	1,2	4,9	0,6
PF	4	R	14,1	0,7	5,3	1,0	12,9	1,3	9,7	1,1	5,2	0,5
PF	5	C	18,7	1,0	6,2	1,9	11,7	0,8	7,9	1,3	4,9	0,8
PF	5	R	15,3	2,0	6,7	1,0	12,6	0,8	9,1	0,6	5,7	0,5
FF	1	C	24,3	1,6	2,6	0,6	8,3	1,0	7,1	0,8	4,4	0,6
FF	1	R	21,9	0,3	9,7	1,2	7,7	0,4	9,9	1,0	5,7	0,6
FF	2	C	16,7	0,9	3,8	0,6	10,7	0,9	8,5	0,3	5,4	0,6
FF	2	R	16,5	1,3	9,9	0,6	15,4	1,8	9,3	1,0	6,2	0,7
FF	3	C	17,0	1,7	5,2	1,1	14,7	0,9	8,4	0,7	4,7	0,7
FF	3	R	12,8	2,0	7,6	2,1	15,8	5,7	10,2	1,2	6,1	1,1
FF	4	C	17,6	2,2	7,6	1,5	10,3	0,7	7,9	0,9	5,5	0,6
FF	4	R	14,0	1,4	5,0	1,3	14,1	1,8	8,5	0,2	5,0	0,4

**Tabla III.1.c** Medias y significación de los efectos en el análisis de varianza de los diferentes factores para los parámetros longitud (LA), peso de la parte aérea (PA) y peso total de la parte aérea (PTA), número de tallos (NT), número de inflorescencias (NI), proporción de hojas (PH), número de folíolos (NF), peso de la corona (PC), longitud (LR), diámetro (DR) y peso de la raíz (PR) en dos variedades de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R), en los diferentes cortes practicados en inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF).

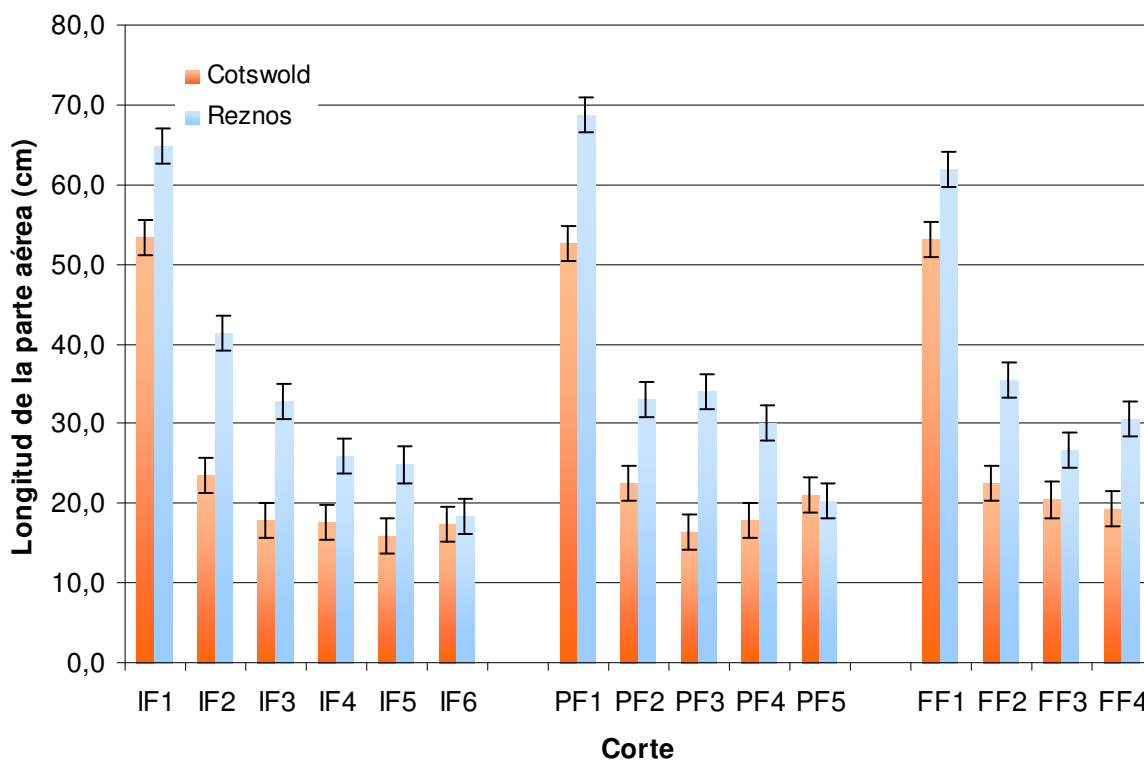
	Tratamiento			SE1	Variedad		SE2	Trat	Cor	Var	Trat xVar	Var xCor
	IF	PF	FF		C	R						
LA	29,5	31,6	33,7	0,31	26,4	36,8	0,58	**	***	***	ns	**
PA	5,8	5,9	8,0	0,27	6,4	6,8	0,29	**	***	ns	ns	ns
PTA	33,1	29,6	31,0	1,46	29,9	33,0	1,18	ns	/	ns	ns	/
NT	6,2	6,7	7,5	0,21	7,6	5,9	0,20	*	***	***	ns	***
NI	3,7	3,5	4,4	0,33	3,4	4,3	0,37	ns	***	ns	ns	***
PH	0,5	0,5	0,4	0,01	0,48	0,41	0,01	ns	***	***	ns	ns
NF	17,7	17,7	17,6	0,31	19,1	16,2	0,24	ns	***	***	ns	ns
PC	5,9	5,1	6,4	0,35	4,8	6,7	0,20	ns	**	***	**	***
LR	13,7	12,7	12,1	0,70	12,5	13,4	0,37	ns	**	ns	ns	ns
DR	8,7	8,9	8,7	0,12	8,1	9,4	0,15	ns	*	***	ns	ns
PR	5,6	5,1	5,4	0,19	5,1	5,6	0,15	ns	ns	**	ns	ns

SE = error estándar; Trat = tratamiento; Cor = corte; Var = variedad; NS, \*, \*\*, \*\*\* significación de la F al nivel de probabilidad  $P > 0,05$ ;  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente.

### III.1.1 Longitud de la parte aérea

La longitud de la parte aérea se vio afectada por los factores ‘tratamiento’ ( $P < 0,01$ ), ‘variedad’ ( $P < 0,001$ ), ‘corte’ ( $P < 0,001$ ) y por la interacción variedad\*corte ( $P < 0,01$ ). La variedad ‘Reznos’ fue significativamente más alta que ‘Cotswold Common’, con 36,8 cm vs 26,4 cm de media, salvo en IF6 y PF5 donde las dos variedades tuvieron una altura similar. Las plantas fueron de mayor longitud en el primer corte, por encima de 50 cm en ‘Cotswold Common’ y de 60 cm en ‘Reznos’. En los siguientes cortes la longitud media se situó entre 20 y 30 cm sin diferencias significativas, salvo en IF2 donde ‘Reznos’ alcanzó 41,4 cm (**Figura III.1.1**).



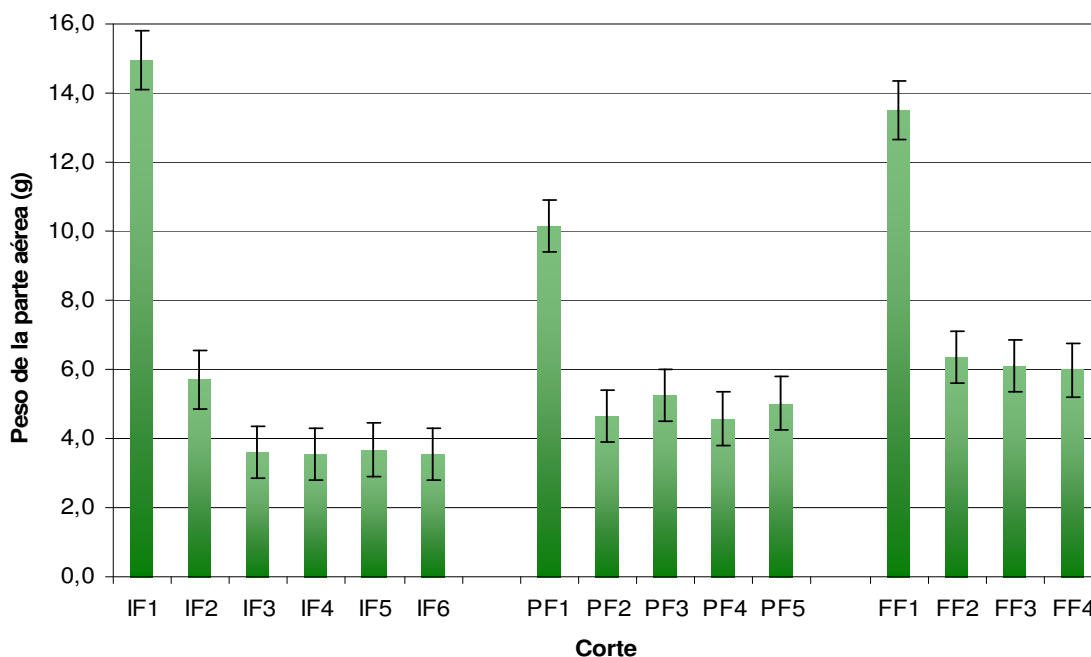


**Figura III.1.1.** Longitud de la parte aérea de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.2 Peso de la parte aérea

El peso de la parte aérea se vio afectado por el tratamiento, siendo el peso medio producido por corte en IF y PF significativamente inferior al peso por corte producido en FF con 5,8 y 5,9 g/planta en IF y PF vs 8,0 g/planta en FF. Sin embargo el diferente número de cortes en cada tratamiento, de 4 a 6 cortes, conllevó que las plantas produjeran en total alrededor de 30 g/planta sin que hubiera diferencias significativas entre tratamientos. La variedad no tuvo efectos significativos. El peso de la parte aérea osciló entre 2,7 g MS/planta (C, IF6) y 16,9 g MS/planta (C, IF1).

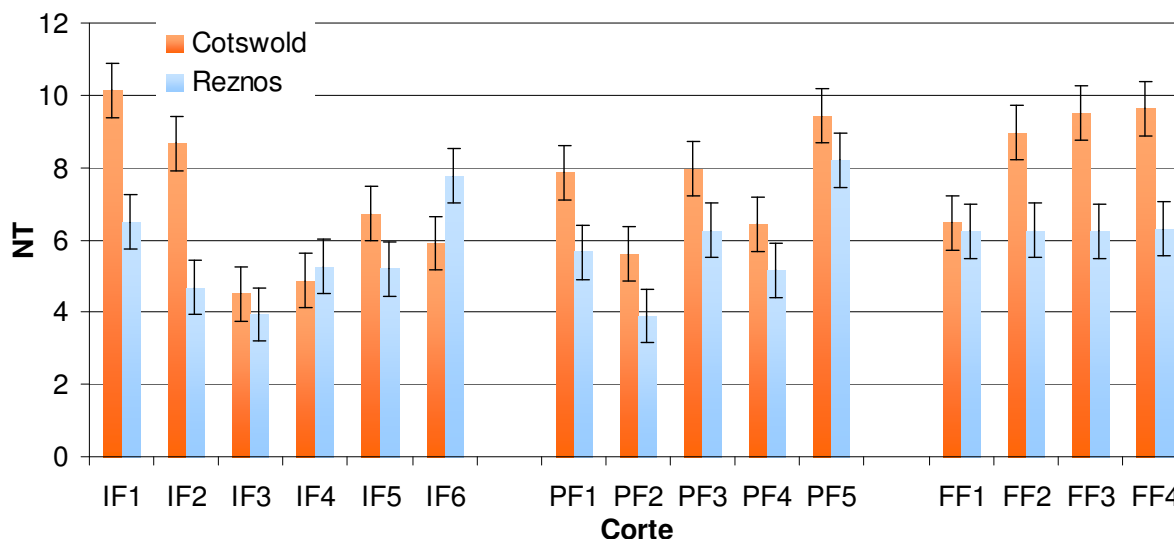
El primer corte fue el más productivo, representando el 42 %, 34 % y 42 % de la producción total en IF, PF y FF, respectivamente, siendo la del primer corte significativamente más elevada que la del resto de cortes. Estos últimos no mostraron diferencias significativas entre ellos, salvo en IF2 (**Figura III.1.2**).



**Figura III.1.2.** Peso de la parte aérea medio de las dos variedades de esparceta en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.3 Número de tallos

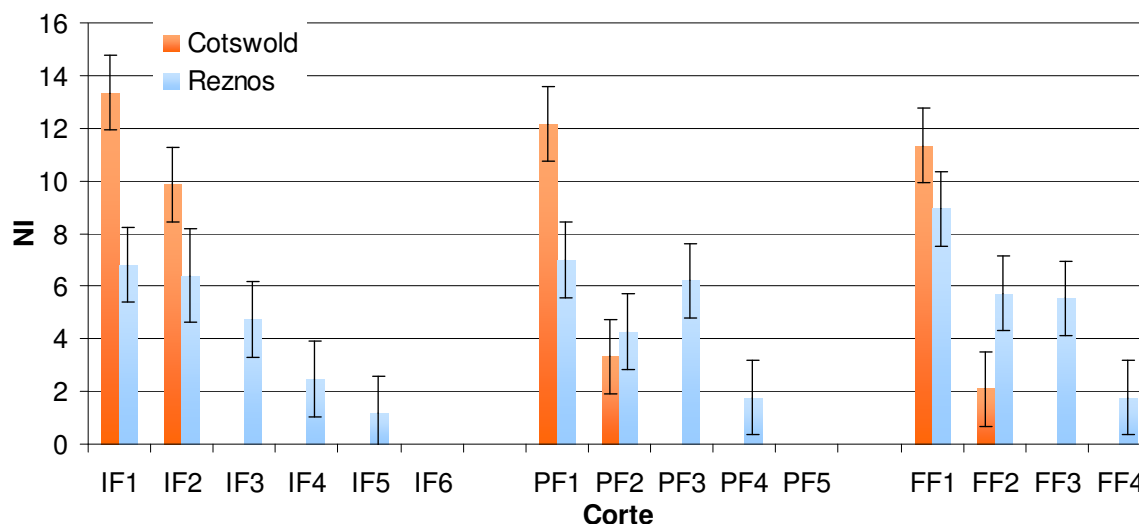
El número de tallos se vio afectado por el tratamiento y la variedad. La interacción variedad\*corte también resultó significativa ( $P < 0,001$ ) (Tabla III.1). En el tratamiento IF, el número de tallos por planta se redujo en los cortes IF3 e IF4, volviendo a incrementarse en IF5 e IF6. ‘Cotswold Common’ produjo mayor número de tallos o fue igual a ‘Reznos’ en todos los cortes salvo en IF6 donde el número de tallos de ‘Reznos’ fue superior. ‘Cotswold Common’ produjo mayor número de tallos en los primeros cortes de IF y PF: IF1, IF2, PF1, PF2 y PF3 y en FF2, FF3 y FF4 (Figura III.1.3).



**Figura III.1.3.** Número de tallos de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.4 Número de inflorescencias

El número de inflorescencias no se vio afectado ni por el tratamiento ni por la variedad. El corte, así como la interacción variedad\*corte fueron significativos ( $P < 0,001$ ). El número de inflorescencias experimentó un declive rápido después de los primeros cortes en IF y del primer corte en PF y FF, particularmente en el caso de ‘Cotswold Common’ como se puede apreciar en la **Figura III.1.4**.

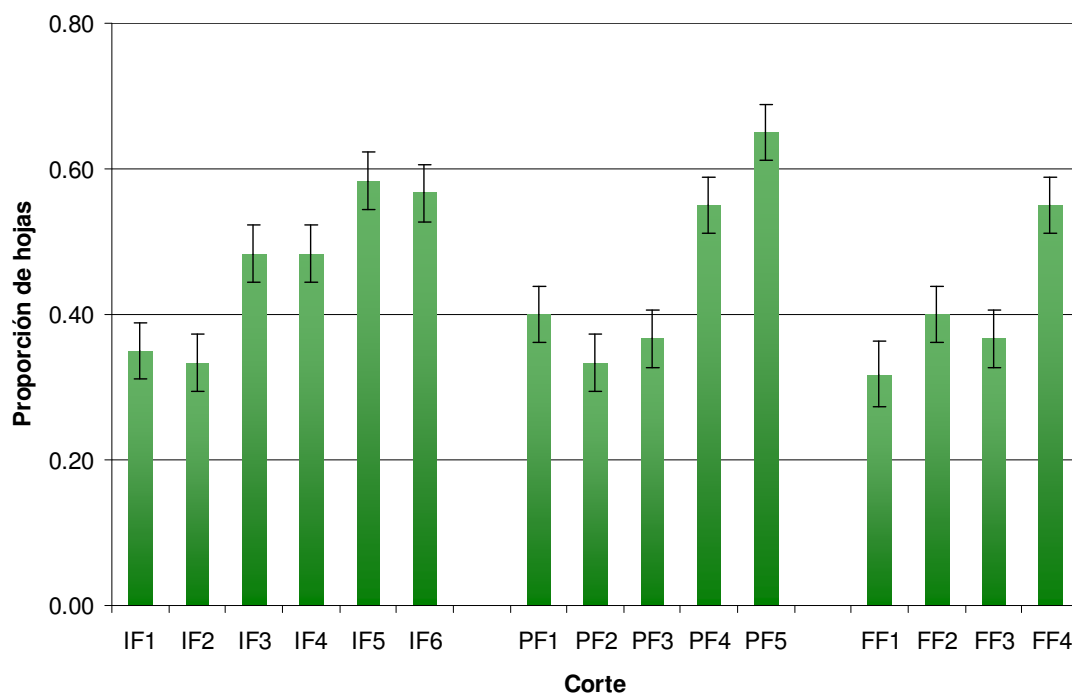


**Figura III.1.4.** Número de inflorescencias de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

La diferencia más notable entre variedades, residió en que, mientras ‘Cotswold Common’ no floreció más que en los dos primeros cortes de IF, PF y FF, ‘Reznos’ mostró inflorescencias en todos los cortes salvo IF6 y PF5.

### III.1.5 Proporción de hojas

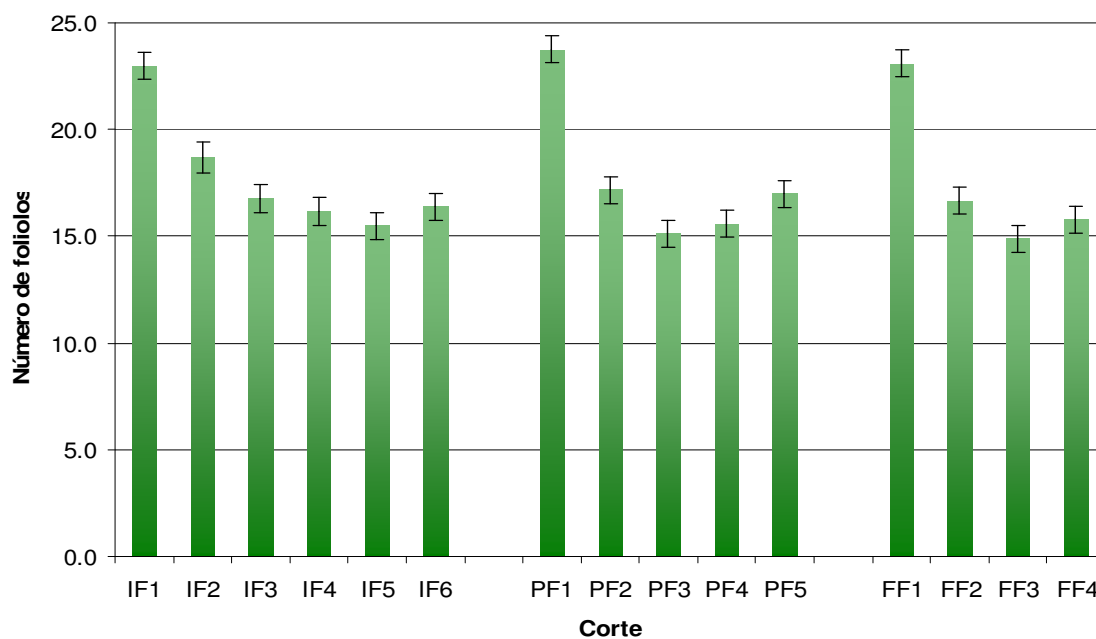
La proporción de hojas se vio afectada significativamente por la variedad y el corte dentro del tratamiento ( $P < 0,001$ ). La proporción de hojas osciló entre 0,25 y 0,70, siendo significativamente más baja en los dos primeros cortes de IF y los tres primeros cortes de PF y FF, con 0,36 de media, frente a 0,55 de proporción de hojas en los últimos cortes de estos mismos tratamientos (**Figura III.1.5**). ‘Cotswold Common’ fue más frondosa que ‘Reznos’ con una proporción de hojas media de 0,48 frente a 0,41 ( $P < 0,001$ ).



**Figura III.1.5.** Proporción de hojas de la esparceta en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.6 Número de foliolos

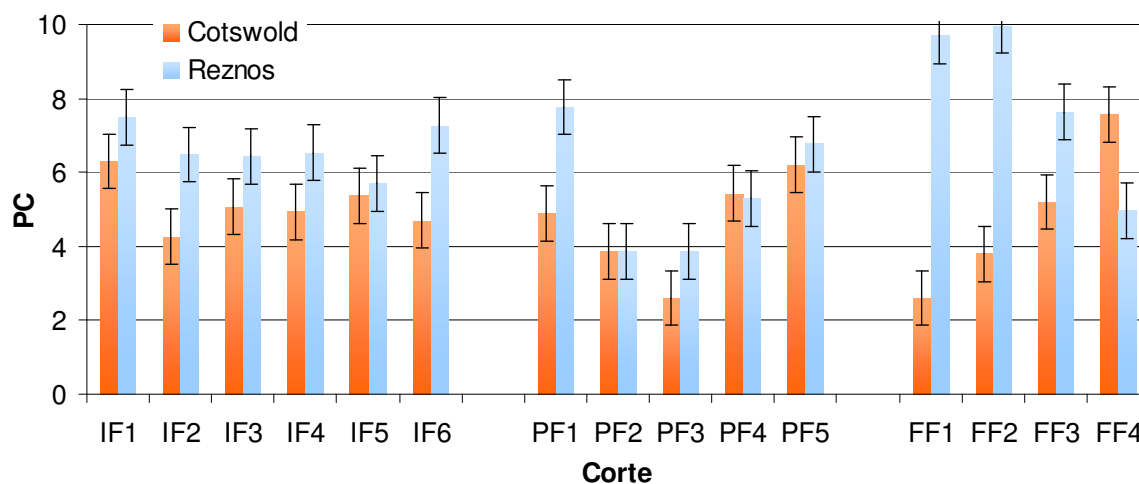
Las variedades divergieron en el número de foliolos ( $P < 0,001$ ). La media de foliolos por hoja fue de 19,1 en ‘Cotswold Common’ vs 16,2 en ‘Reznos’. Ambas variedades presentaron un número de foliolos por hoja más elevado (23,3) en el primer corte de cada tratamiento que en los siguientes (16,3) como se puede apreciar en la **Figura III.1.6**.



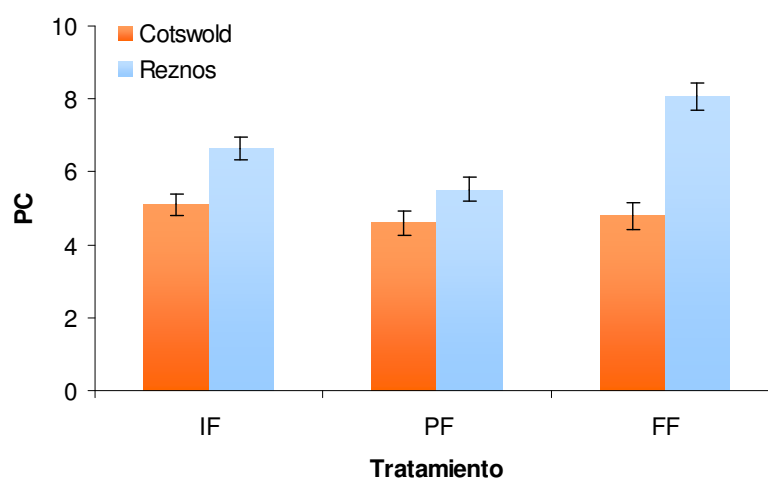
**Figura III.1.6.** Número de foliolos de la esparceta en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.7 Peso de la corona

El peso de la corona se vio afectado por la variedad, el corte, así como por las interacciones tratamiento\*variedad y variedad\*corte (Tabla III.1.c) (Figura III.1.7.a y III.1.7.b). En general, el peso de la corona fue mayor en ‘Reznos’ que en ‘Cotswold Common’. Las diferencias más importantes se obtuvieron en PF1 y FF1 y FF2 respectivamente. Por otra parte, en el corte FF4, el peso de la corona de ‘Reznos’ fue más elevado que el de ‘Cotswold Common’, 7,6 g vs 5,0 g (Figura III.1.7.a). En lo referente a la interacción tratamiento\*variedad, aunque el peso de la corona fue siempre más elevado en ‘Reznos’ que en ‘Cotswold Common’, las diferencias entre ambas fueron más importantes en FF, mientras que en PF las diferencias fueron las menos importantes (Figura III.1.7.b).



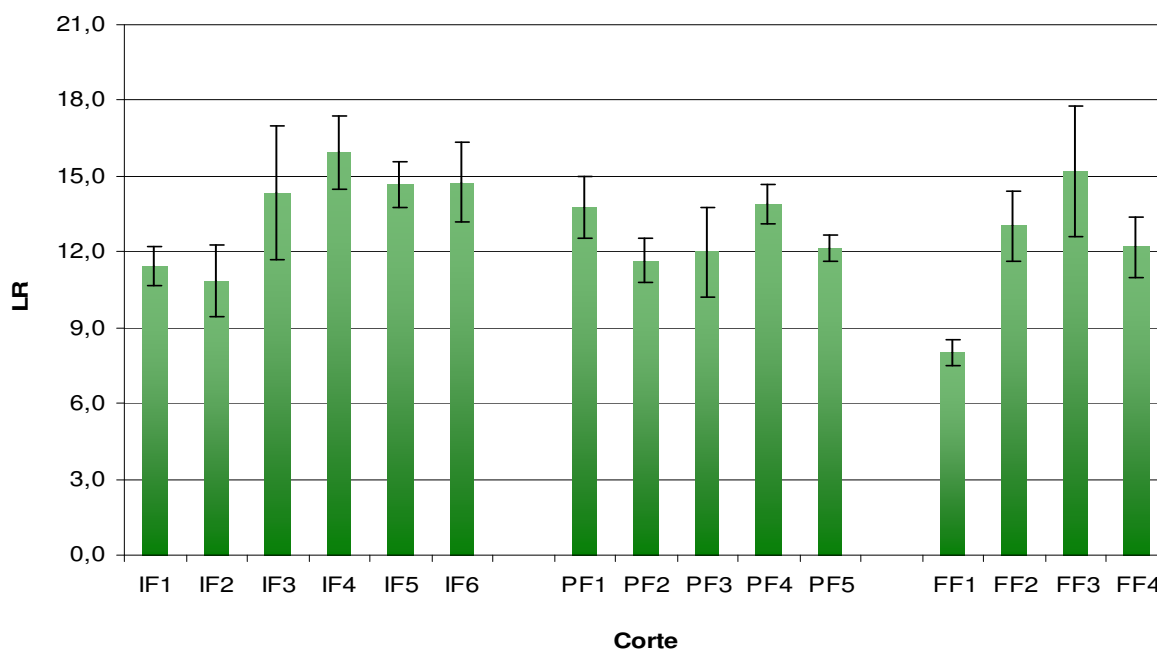
**Figura III.1.7.a** Peso de la corona PC (en g) de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.



**Figura III.1.7.b** Peso de la corona PC (en g) de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.8 Longitud de la raíz

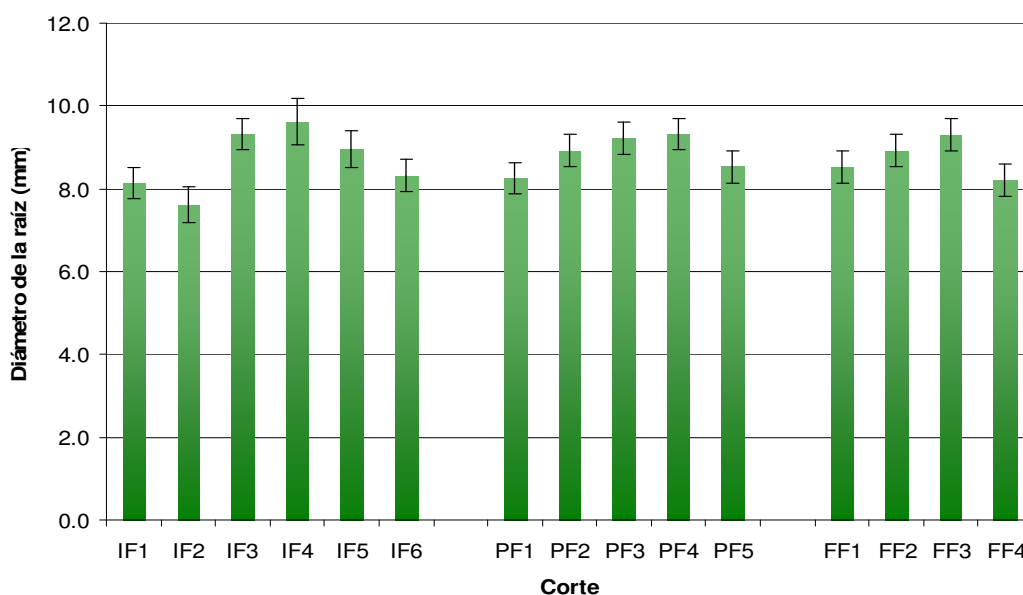
La longitud de la raíz no se vio afectada ni por el tratamiento ni por la variedad, pero si por el corte (**Tabla III.1.c**). La longitud de la raíz fue superior en IF4 frente a IF2 y en FF2, FF3 y FF4 frente a FF1 (**Figura III.1.8**).



**Figura III.1.8.** Longitud de la raíz LR (en cm) de la esparceta en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.1.9 Diámetro de la raíz

El diámetro de la raíz fue significativamente mayor en ‘Reznos’ con 9,4 mm vs 8,1 mm en ‘Cotswold Common’. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (**Figura III.1.9**). Sin embargo, en el tratamiento IF, el diámetro de la raíz fue superior en IF3 y IF4 (9,6 mm de media) que en el resto de cortes (8,0 mm de media).



**Figura III.1.9.** Diámetro de la raíz de la esparceta en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### **III.1.10 Peso de la raíz**

El peso de la raíz se vio afectado únicamente por la variedad (**Tabla III.1.c**). ‘Reznos’ presentó un peso de raíz más elevado que ‘Cotswold Common’ con 5,6 g frente a 5,1 g.

### III.2 Composición química de la materia seca

#### III.2.1 Composición química de la parte aérea

En la **Tabla III.2.1.a** se recogen los contenidos medios y la desviación típica en PB, FND, FAD, LAD y TC de la parte aérea. En la **Tabla III.2.1.b** se resumen los valores de los distintos parámetros, así como la significación de los efectos y de las interacciones obtenidas en el análisis de varianza realizado para cada determinación.

**Tabla III.2.1.a** Composición química de la parte aérea (%): proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD) y taninos condensados TC) de dos variedades de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R) en los diferentes cortes practicados en inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF) en 2009 (DE, desviación estándar). Media de tres repeticiones.

Trat	Corte	Var	PB		FND		FAD		LAD		TC	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
IF	1	C	23,1	0,8	21,1	2,0	15,0	1,6	1,9	0,6	2,5	0,2
IF	1	R	16,0	0,7	32,8	1,6	22,7	1,3	3,8	0,5	1,8	0,2
IF	2	C	15,7	0,7	41,5	1,6	30,6	1,3	7,8	0,5	2,6	0,2
IF	2	R	14,0	0,8	40,7	2,0	30,0	1,6	6,8	0,6	2,7	0,2
IF	3	C	14,9	0,7	41,5	1,6	30,6	1,3	9,1	0,5	3,5	0,2
IF	3	R	13,3	0,7	48,4	1,6	35,8	1,3	8,7	0,5	1,8	0,2
IF	4	C	15,4	0,7	39,0	1,6	28,6	1,3	8,4	0,5	3,6	0,2
IF	4	R	14,2	0,8	40,5	2,0	30,3	1,6	7,4	0,6	2,6	0,2
IF	5	C	15,3	0,7	42,7	1,6	31,5	1,3	9,2	0,5	2,8	0,2
IF	5	R	12,6	0,8	45,1	2,0	33,3	1,6	8,6	0,6	2,7	0,2
IF	6	C	17,7	0,7	38,2	1,6	28,0	1,3	8,6	0,5	3,3	0,2
IF	6	R	16,6	0,8	41,3	2,0	30,3	1,6	8,5	0,6	2,3	0,2
PF	1	C	20,2	0,7	24,7	1,6	17,1	1,3	3,0	0,5	2,9	0,2
PF	1	R	13,8	0,7	34,0	2,0	22,6	1,6	3,8	0,6	1,8	0,2
PF	2	C	14,3	0,7	37,9	1,6	27,8	1,3	7,2	0,5	3,3	0,2
PF	2	R	12,0	0,7	49,2	1,6	36,9	1,3	8,9	0,5	1,8	0,2
PF	3	C	15,2	0,7	43,9	2,0	33,2	1,6	9,7	0,6	3,1	0,2
PF	3	R	12,9	0,7	48,8	1,6	36,4	1,3	8,7	0,5	2,0	0,2
PF	4	C	15,1	0,7	36,3	1,6	26,5	1,3	7,9	0,5	3,7	0,2
PF	4	R	16,3	0,7	29,5	2,0	21,7	1,6	4,5	0,6	2,9	0,2
PF	5	C	15,2	0,8	40,5	2,0	29,4	1,6	9,0	0,6	2,9	0,2
PF	5	R	14,2	0,8	40,8	1,6	28,9	1,3	7,4	0,5	2,9	0,2
FF	1	C	16,3	0,8	33,6	2,0	23,1	1,6	3,8	0,6	2,3	0,2
FF	1	R	13,5	0,7	38,0	1,6	24,9	1,3	3,9	0,5	1,3	0,2
FF	2	C	14,6	0,7	42,4	1,6	31,3	1,3	7,8	0,5	2,9	0,2
FF	2	R	12,1	0,7	45,4	1,6	33,0	1,3	7,7	0,5	2,2	0,2
FF	3	C	15,0	0,7	39,0	1,6	28,3	1,3	7,5	0,5	3,3	0,2
FF	3	R	14,8	0,7	38,5	1,6	28,7	1,3	6,4	0,5	2,8	0,2
FF	4	C	14,4	0,7	44,0	1,6	30,9	1,3	10,0	0,5	2,6	0,2
FF	4	R	13,0	0,7	40,3	1,6	29,1	1,3	7,0	0,5	2,9	0,2



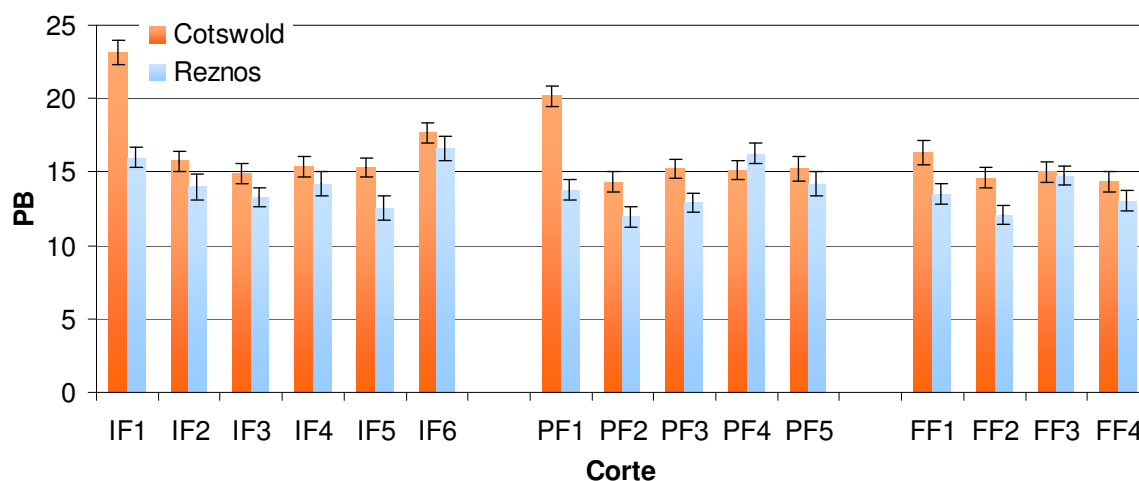
**Tabla III.2.1.b** Medias y significación de los efectos en el análisis de varianza de los diferentes factores para el contenido en proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD) y taninos condensados (TC) de la parte aérea de dos variedades de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R) sometidas a ritmos de corte en inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF) en 2009.

	Tratamiento				Variedades			Trat	Cor	Var	Trat xVar	Var xCor
	IF	PF	FF	SE1	C	R	SE2					
PB	15,7	14,9	14,2	0,09	16	13,9	0,19	***	***	***	ns	***
FND	39,4	38,6	40,1	0,27	37,9	40,8	0,46	*	***	***	ns	***
FAD	28,9	28,1	28,7	0,22	27,5	29,6	0,36	ns	***	***	ns	***
LAD	7,4	7,1	6,8	0,10	7,4	6,7	0,13	*	***	**	ns	***
TC	2,7	2,7	2,6	0,48	3,0	2,3	0,42	ns	***	***	ns	***

SE = error estándar; Trat = tratamiento; Cor = corte; Var = variedad; ns, \*, \*\*, \*\*\* significación de la F al nivel de probabilidad  $P > 0,05$ ;  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ , respectivamente.

### III.2.1.1 Contenido en PB

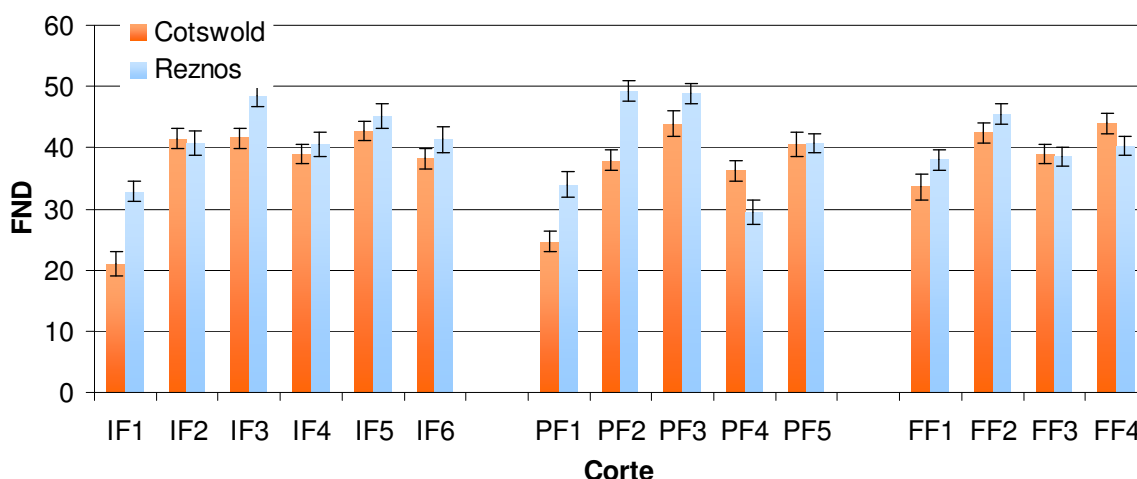
El tratamiento afectó de forma significativa al contenido en PB que experimentó un descenso de IF a FF, con 15,7 %, 14,9 % y 14,2 % de media, respectivamente. En IF y PF, hubo una diferencia media claramente significativa entre el primer corte y los cortes siguientes, 19,6 % vs 14,9 %, que fue menos marcada en FF. La variedad ‘Cotswold Common’ tuvo un contenido de PB de 19,9 %, significativamente más alto que ‘Reznos’, 14,4 % en los primeros cortes de cada tratamiento (IF1, PF1 PF2, PF3, FF1 y FF2) (**Figura III.2.1.1**).



**Figura III.2.1.1.** Contenido en proteína bruta (PB, en %) de la parte aérea de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.1.2 Contenido en FND

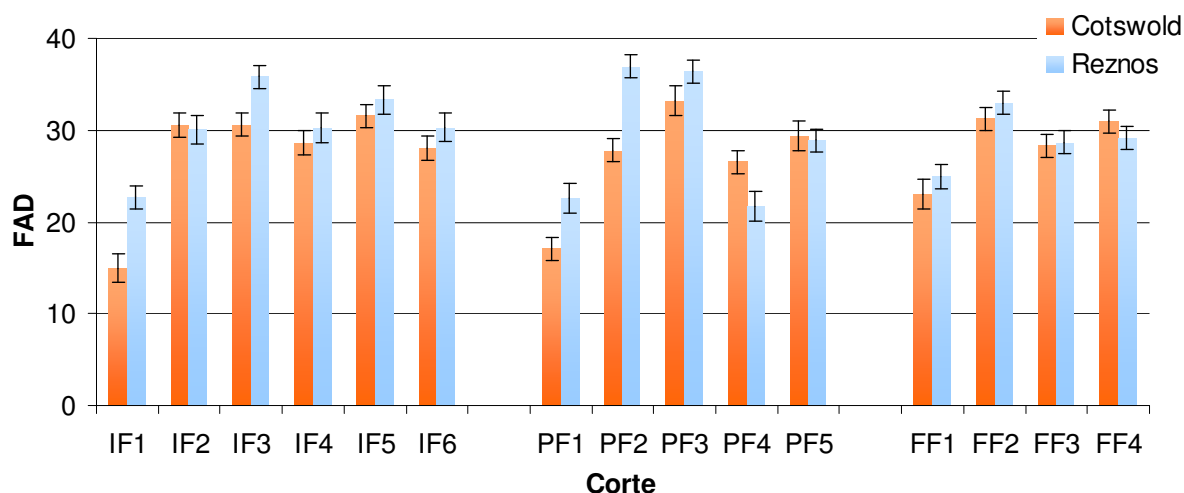
El contenido en FND se vio afectado significativamente por el tratamiento ( $P < 0,05$ ), la variedad ( $P < 0,001$ ) y el corte ( $P < 0,001$ ). La interacción variedad\*corte también resultó significativa ( $P < 0,001$ ). El factor que tuvo el mayor peso explicativo fue el corte; la principal diferencia se encontró entre el primer corte en los tres tratamientos y los siguientes (**Figura III.2.1.2**). El contenido en FND osciló entre 21,1 % y 48,8 % con una media de 40 %. Los primeros cortes (IF1, PF1 y FF1) presentaron un contenido de FND medio de 31% vs 42% en los cortes sucesivos. Fue más elevado en ‘Reznos’ que en ‘Cotswold Common’ (40,8 % vs 37,9 %) (Tabla III.2.1.b). ‘Cotswold Common’, sin embargo, presentó valores más elevados en FND en PF4 PF5 y FF4 (**Figura III.2.1.2**).



**Figura III.2.1.2.** Contenido en fibra neutro detergente (FND, en %) de la parte aérea de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.1.3 Contenido en FAD

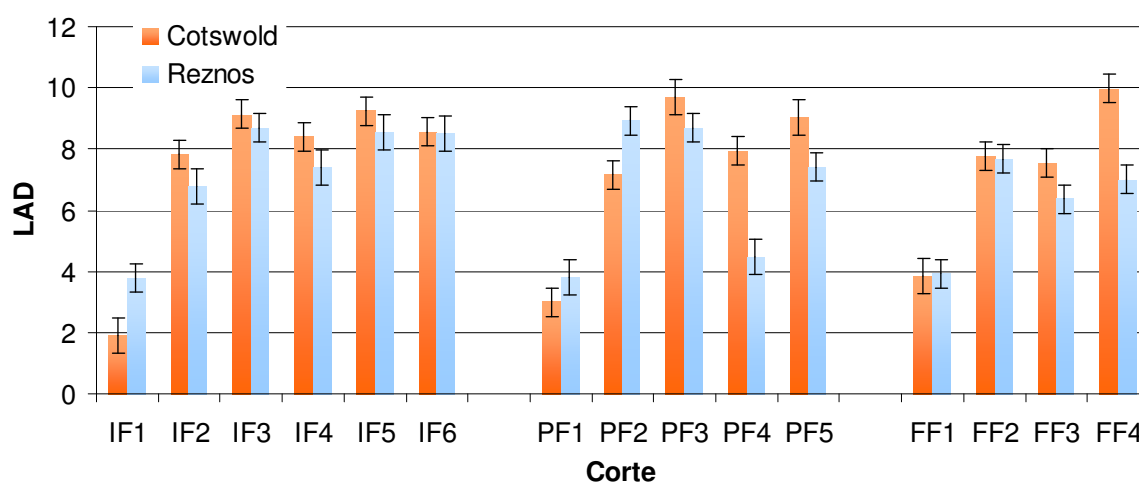
El contenido en FAD experimentó una evolución similar al contenido en FND. No se observaron diferencias entre tratamientos, pero tanto los factores corte y variedad como la interacción entre ambos, resultaron significativos ( $P < 0,001$ ) (**Tabla III.2.1.b**) Al igual que para el contenido en FND, los valores más bajos de FND se obtuvieron en los primeros cortes realizados en cada tratamiento (**Figura III.2.1.3**). La parte aérea de ‘Reznos’ presentó valores de FAD más elevados que los de ‘Cotswold Common’ en la mayor parte de los cortes dentro de cada tratamiento; el contenido en FAD de ambas variedades divergió en IF1, IF2, PF1 y PF2. Por otra parte, en el cuarto corte del tratamiento PF, el contenido en FAD de ‘Cotswold Common’ fue superior al de ‘Reznos’ (**Figura III.2.1.3**).



**Figura III.2.1.3.** Contenido en fibra ácido detergente (FAD, en %) de la parte aérea de 'Cotswold Common' y 'Reznos' en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

#### III.2.1.4 Contenido en LAD

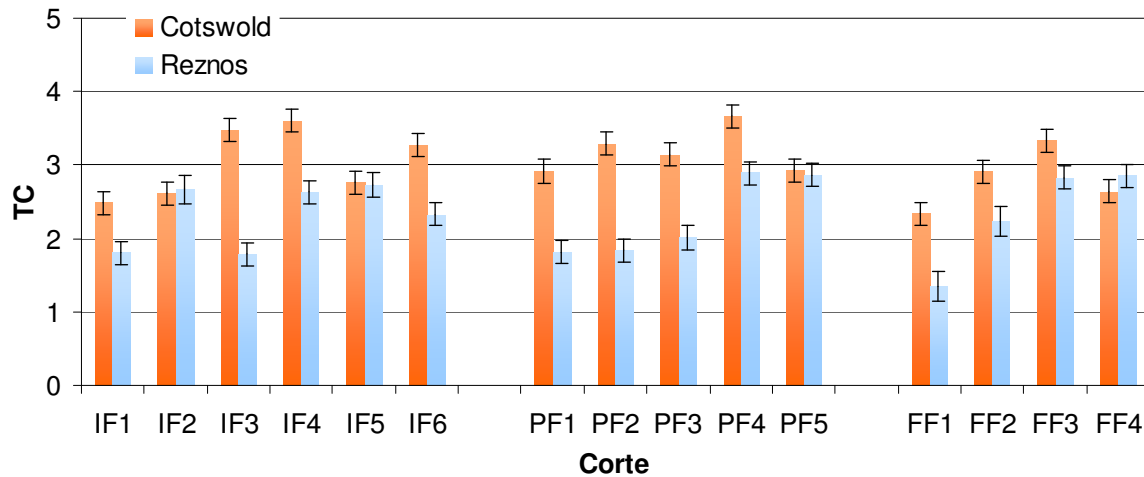
El tratamiento, el corte, la variedad y la interacción variedad\*corte afectaron de forma significativa al contenido en LAD, como se puede apreciar en la **Tabla III.2.1.b**. El contenido en LAD disminuyó ligeramente desde el tratamiento IF a FF. En cada tratamiento, el contenido en LAD del forraje del primer corte fue inferior al obtenido en el resto de cortes. En el tratamiento IF no se observaron diferencias entre variedades a lo largo de los cortes efectuados salvo en IF1 en el cual el contenido en LAD de 'Reznos' fue superior al de 'Cotswold Common'. En el tratamiento PF, en el segundo corte realizado, 'Reznos' presentó valores de LAD superiores a los de 'Cotswold Common'; sin embargo, en PF4 y PF5, así como en los dos últimos cortes del tratamiento FF, el contenido en LAD de 'Cotswold Common' fue superior al de 'Reznos' (**Figura III.2.1.4**).



**Figura III.2.1.4.** Contenido en lignina ácido detergente (LAD, en %) de la parte aérea de 'Cotswold Common' y 'Reznos' en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.1.5 Contenido en TC

El contenido en TC no se vio afectado por el tratamiento, con una media de 2,7 %, pero si por el corte dentro de cada tratamiento, la variedad y la interacción entre los mismos (**Tabla III.2.1.b**). El contenido en TC de ‘Cotswold Common’ fue superior al de ‘Reznos’ (3,0 % vs 2,3 % de media) en la mayor parte de los cortes, salvo en IF2, IF5, PF5 y FF4, en los que el % de TC de ambas variedades fue similar (**Figura III.2.1.5.**)



**Figura III.2.1.5.** Contenido en taninos condensados (TC, en %) de la parte aérea de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.2 Composición química de la corona y de la raíz

En la **Tabla III.2.2.a** se recogen los valores medios y los valores de desviación típica en AL, AZ y PB, de la corona y de la raíz. En la **Tabla III.2.2.b** se resumen los valores de los distintos parámetros, así como la significación de los factores en el análisis de la varianza realizado.

**Tabla III.2.2.a** Composición química de la corona y de la raíz (%): almidón (AL), azúcares solubles (AZ) y proteína bruta (PB) de dos variedades de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R) en los diferentes cortes practicados en inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF) en 2009 (DE, desviación estándar). Media de tres repeticiones.

Trat	Corte	Var	Corona						Raíz					
			AL		AZ		PB		AL		AZ		PB	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
IF	1	C	4,0	0,4	3,1	0,2	12,5	0,6	2,9	0,6	3,8	0,4	7,7	0,7
IF	1	R	6,1	0,4	4,3	0,2	13,0	0,6	8,3	0,6	6,3	0,4	10,8	0,7
IF	2	C	4,1	0,4	2,7	0,2	12,4	0,6	2,5	0,6	3,4	0,4	7,7	0,7
IF	2	R	3,4	0,4	2,3	0,2	11,4	0,6	4,5	0,6	3,4	0,4	10,4	0,7
IF	3	C	5,1	0,4	3,1	0,2	14,2	0,6	6,0	0,6	4,8	0,4	9,5	0,7
IF	3	R	3,6	0,4	2,4	0,2	11,8	0,6	5,3	0,6	4,3	0,4	7,6	0,7
IF	4	C	3,9	0,4	3,0	0,2	14,1	0,6	5,5	0,8	5,0	0,5	9,3	0,9
IF	4	R	3,9	0,4	2,6	0,2	12,1	0,6	7,1	0,8	4,9	0,4	8,3	0,7
IF	5	C	4,6	0,4	3,9	0,2	14,2	0,6	7,0	0,6	5,3	0,4	11,5	0,7
IF	5	R	4,7	0,4	3,2	0,2	12,4	0,6	9,3	0,6	5,7	0,4	11,7	0,7
IF	6	C	3,8	0,4	2,9	0,2	13,6	0,6	5,2	0,6	4,5	0,4	10,2	0,7
IF	6	R	4,4	0,4	2,5	0,2	13,6	0,6	7,2	0,6	4,8	0,4	10,8	0,7
PF	1	C	4,1	0,4	3,9	0,2	14,0	0,6	5,3	0,6	4,8	0,4	9,4	0,7
PF	1	R	6,8	0,4	4,3	0,2	14,6	0,6	7,5	0,6	5,0	0,4	11,0	0,7
PF	2	C	4,0	0,4	3,3	0,2	15,7	0,6	5,4	0,6	4,9	0,4	11,4	0,7
PF	2	R	3,8	0,4	2,6	0,2	12,4	0,6	4,0	0,6	4,0	0,4	9,0	0,7
PF	3	C	4,2	0,4	3,4	0,2	13,0	0,6	4,1	0,6	3,7	0,4	10,7	0,7
PF	3	R	3,6	0,4	2,4	0,2	12,1	0,6	6,0	0,6	4,4	0,4	8,6	0,7
PF	4	C	4,9	0,4	3,6	0,2	14,7	0,6	5,9	0,6	6,1	0,4	10,5	0,7
PF	4	R	6,0	0,4	4,4	0,2	12,8	0,6	10,0	0,6	7,5	0,4	10,7	0,7
PF	5	C	6,7	0,4	3,9	0,2	16,4	0,6	8,0	0,8	5,5	0,4	12,7	0,7
PF	5	R	5,8	0,4	3,1	0,2	14,3	0,6	6,8	0,8	5,4	0,5	10,4	0,9
FF	1	C	4,5	0,4	4,1	0,2	13,8	0,6	4,3	0,6	4,8	0,4	8,9	0,7
FF	1	R	6,0	0,4	3,7	0,2	13,9	0,6	8,6	0,6	5,6	0,4	11,0	0,7
FF	2	C	5,4	0,4	4,2	0,2	14,6	0,6	5,6	0,6	5,0	0,4	12,2	0,7
FF	2	R	4,8	0,4	3,2	0,2	10,9	0,6	7,5	0,6	6,0	0,4	10,0	0,7
FF	3	C	5,5	0,4	3,8	0,2	13,6	0,6	8,7	0,6	5,5	0,4	11,3	0,7
FF	3	R	4,8	0,4	2,8	0,2	12,5	0,6	7,1	0,6	5,3	0,4	9,7	0,7
FF	4	C	5,7	0,4	3,8	0,2	16,8	0,6	6,9	0,6	5,4	0,4	13,0	0,7
FF	4	R	5,6	0,4	4,2	0,2	14,2	0,6	11,6	0,6	7,5	0,4	13,2	0,7

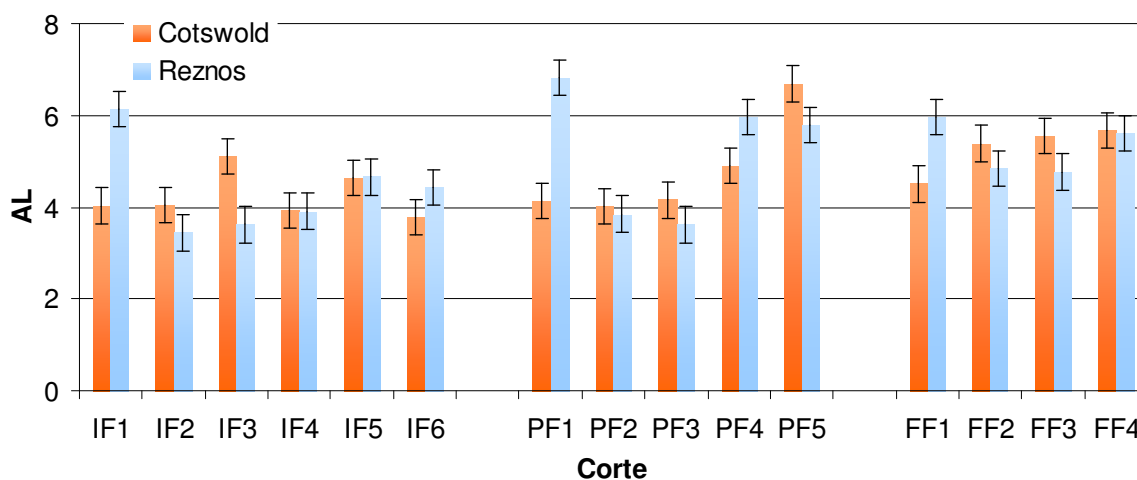
**Tabla III.2.2.b** Medias y significación de los efectos en el análisis de varianza de los diferentes factores para los contenidos en almidón (AL), azúcares solubles (AZ) y proteína bruta (PB) de la corona (%) y de la raíz (%), de dos variedades de esparceta ‘Cotswold Common’ (C) y ‘Reznos’ (R) sometidas a tres ritmos de corte: inicio de floración (IF), plena floración (PF) y final de floración (FF), en 2009.

	Tratamiento				Variedades			Trat	Cor	Var	Trat xVar	Var xCor
	IF	PF	FF	SE	C	R	SE					
<b>Corona</b>												
AL	4,3	5,0	5,3	0,17	4,8	5,0	0,10	*	***	ns	ns	***
AZ	3,0	3,5	3,7	0,10	3,6	3,3	0,06	*	***	***	ns	***
PB	12,9	14	13,8	0,26	14,3	12,8	0,17	ns	***	***	ns	*
<b>Raíz</b>												
AL	5,9	6,3	7,6	0,24	5,7	7,5	0,17	*	***	***	ns	***
AZ	4,7	5,1	5,7	0,12	4,9	5,4	0,10	*	***	***	ns	***
PB	9,6	10,4	11,2	0,24	10,5	10,3	0,19	*	***	ns	ns	***

SE = error estándar; Trat = tratamiento; Cor = corte; Var = variedad; NS, \*, \*\*, \*\*\* significación de la F al nivel de probabilidad P>0,05; P<0,05; P<0,01 y P<0,001, respectivamente.

### III.2.2.1 Contenido en AL de la corona

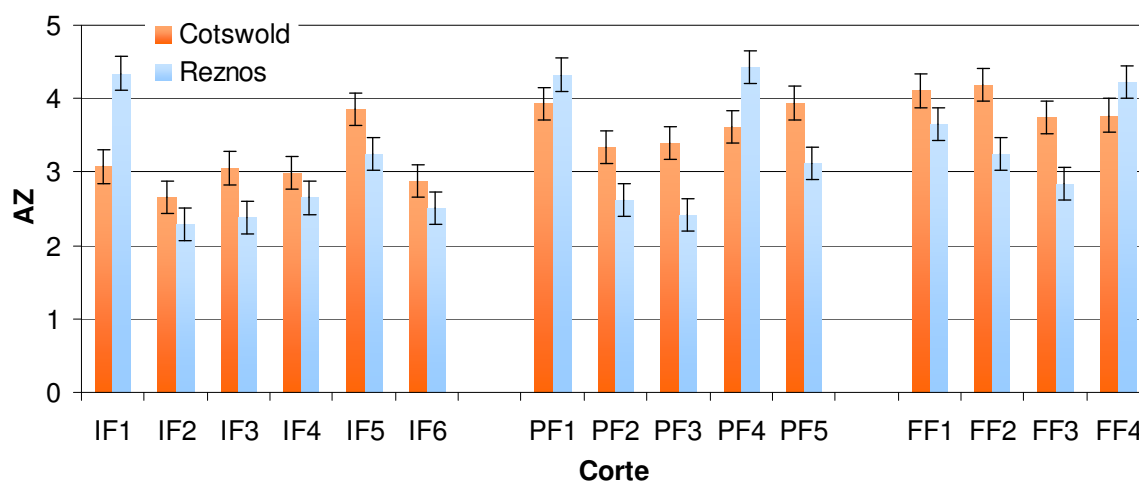
El contenido en AL estuvo afectado por el tratamiento, siendo significativamente más bajo en IF que en PF y FF (medias de 4,3 % vs 5,0 % y 5,3 %) Hubo una interacción significativa (P<0,001) corte\*variedad, siendo el contenido de almidón de ‘Reznos’ más elevado que el de ‘Cotswold Common’ en los primeros cortes, mientras que en IF3, PF5 y FF3, ‘Cotswold Common’ presentó mayores porcentajes de almidón que ‘Reznos’ (**Figura III.2.2.1**).



**Figura III.2.2.1.** Contenido en almidón (AL, en %) de la corona de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.2.2 Contenido en AZ de la corona

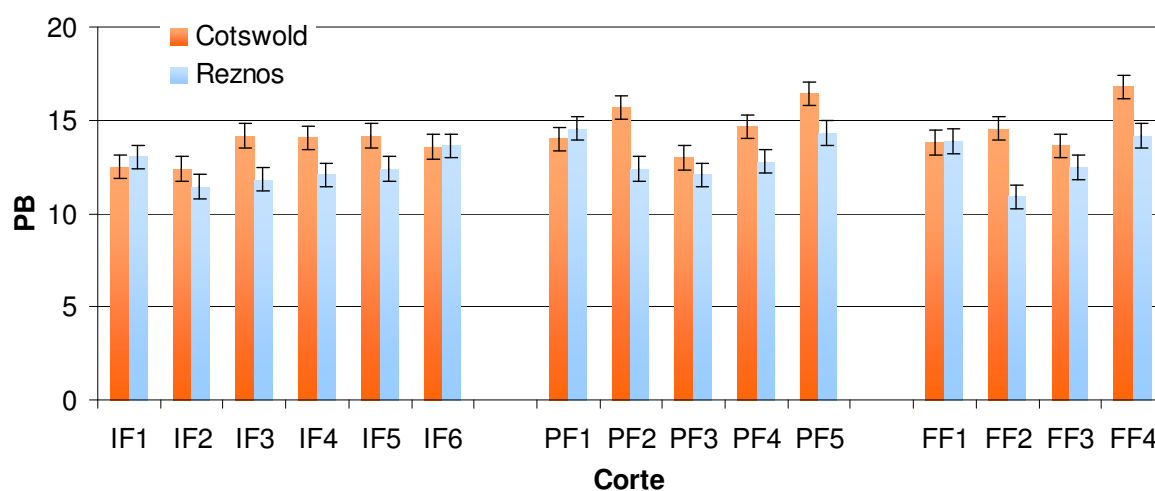
El contenido en AZ de la corona estuvo significativamente afectado por el tratamiento, incrementándose de IF a PF y FF, con 3,0 %, 3,5 % y 3,7 % de media, respectivamente. La interacción corte\*variedad resultó significativa ( $P < 0,001$ ) (Tabla III.2.2.b), presentando ‘Reznos’ niveles significativamente superiores en AZ en IF1 y PF4, mientras que ‘Cotswold Common’ tuvo contenidos de AZ más altos en IF5, PF3, PF5, FF2 y FF3 (Figura III.2.2.2).



**Figura III.2.2.2.** Contenido en azúcares (AZ, en %) de la corona de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.2.3 Contenido en PB de la corona

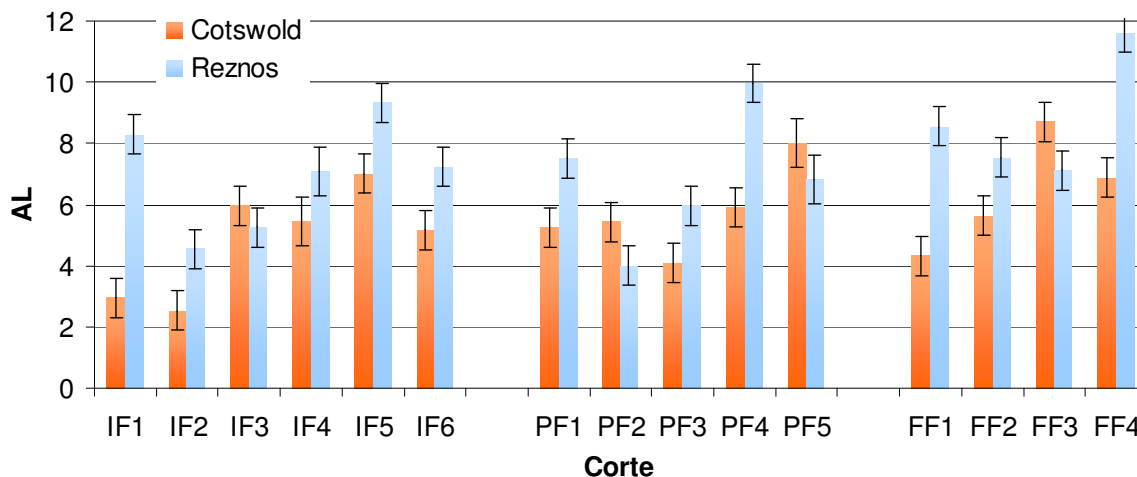
El contenido en PB de la corona se vio afectado por los factores corte, variedad y por la interacción de ambos (Tabla III.2.2.b). ‘Cotswold Common’ presentó valores de PB más elevados que ‘Reznos’ en IF3, IF4, IF5, PF2, PF4, PF5, FF2 y FF4. (Figura III.2.2.3).



**Figura III.2.2.3.** Contenido en proteína bruta (PB, en %) de la corona de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.2.4 Contenido en AL de la raíz

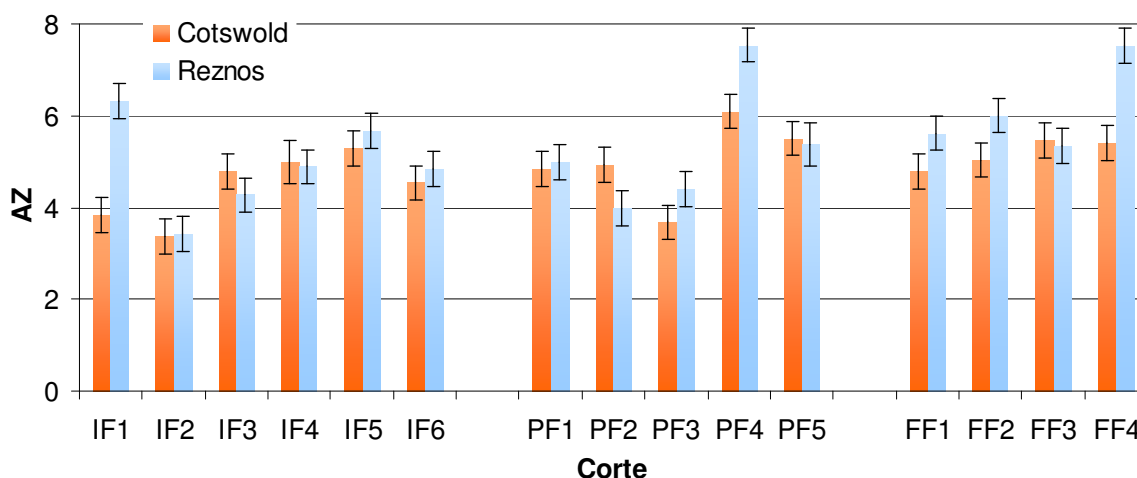
El contenido en AL de la raíz se vio afectado por el tratamiento, apreciándose un incremento entre IF, PF y FF, con 5,9 %, 6,3 %, y 7,6 % de media, respectivamente (**Tabla III.2.2.b**). Así mismo, los factores corte, variedad y la interacción variedad\*corte resultaron significativos ( $P < 0,001$ ). La variedad ‘Reznos’ presentó un contenido superior a ‘Cotswold Common’ salvo en IF3, PF2, PF5 y FF3, siendo el contenido de AL de ‘Cotswold Common’ en este último corte superior al de ‘Reznos’ (**Figura III.2.2.4**).



**Figura III.2.2.4.** Contenido en almidón (AL, en %) de la raíz de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

### III.2.2.5 Contenido en AZ de la raíz

El contenido en AZ de la raíz se vio afectado por el tratamiento, incrementándose de media de 4,7 % en IF a 5,7 % en FF (5,1 % en PF). El factor ‘variedad’ fue significativo en FF donde los contenidos del 5,4 % en ‘Reznos’ superaron a los contenidos del 4,9 % en ‘Cotswold Common’, salvo en FF3 donde se igualaron. ‘Reznos’ presentó un contenido más elevado en AZ en IF1, PF4 y FF4, mientras su contenido fue inferior en PF2 (**Figura III.2.2.5**).

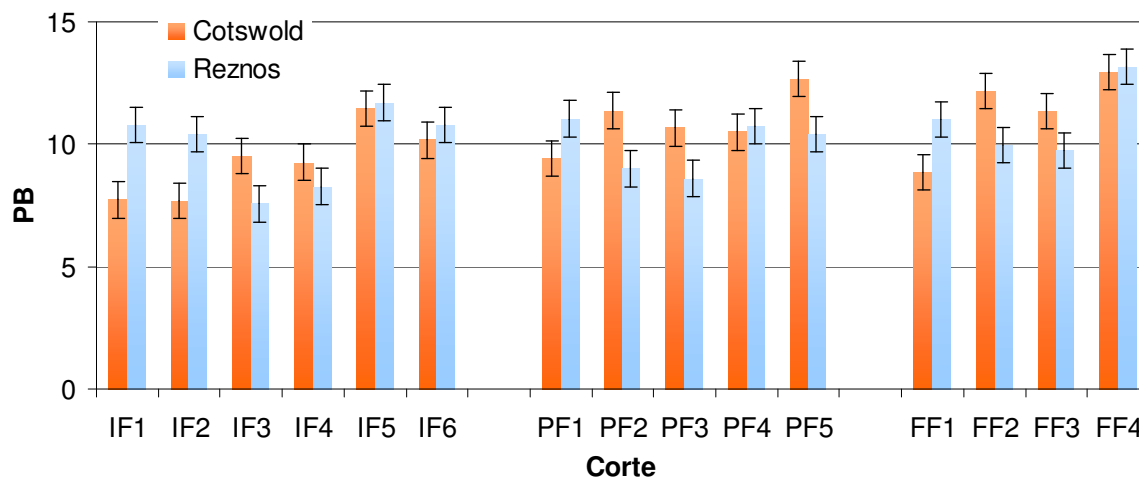


**Figura III.2.2.5.** Contenido en azúcares (AZ, en %) de la raíz de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.



### III.2.2.6 Contenido en PB de la raíz

El tratamiento afectó de manera significativa al contenido en PB de la raíz, el cual se incrementó a medida que disminuyó el ritmo de corte (**Figura III.2.2.6**). El contenido fue de media del 9,6 % en IF, 10,4 % en PF y 11,2 % en FF, no siendo PF significativamente distinto de IF o FF. El contenido en PB no estuvo afectado por la variedad, pero si por el corte dentro de cada tratamiento y por la interacción corte\*variedad, siendo el contenido en PB de ‘Reznos’ más elevado en los primeros cortes de cada tratamiento (IF1, IF2, PF1 y FF1) mientras que presentó valores inferiores a ‘Cotswold Common’ en IF3, PF2, PF5 y FF3.



**Figura III.2.2.6.** Contenido en proteína bruta (PB, en %) de la raíz de ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ en los cortes de los tratamientos IF, PF y FF.

## IV DISCUSIÓN

### IV.1 Producción de forraje

La producción total de forraje no estuvo afectada por el factor ‘tratamiento’, siendo el peso total de la parte aérea producida no significativamente diferente en IF, PF y FF. Aunque el peso medio por corte fue inferior en IF y PF con respecto a FF, el mayor número de cortes que se practicaron equilibró la producción final. Al contrario que ocurre en otras especies como la alfalfa, la producción de forraje en la esparceta varió poco con el avance de la floración. En condiciones similares a nuestro ensayo, Alibes *et al.* (1979) y Delgado *et al.* (2010a) no apreciaron diferencias o éstas fueron escasas. Ello podría atribuirse a que la planta alcanza ya su máximo desarrollo en estados precoces de la floración y se estabiliza su crecimiento, como se comprobará cuando se discuta la composición química del forraje que sufre escasas alteraciones con el progreso de la floración.

El factor ‘corte’ fue altamente significativo, representando el primer corte el 42 %, 34 % y 42 % en IF, PF y FF respectivamente. Esta proporción mayor de la producción de forraje en primavera es una característica de la especie. En un manejo tradicional en condiciones de secano, se efectúan de dos a tres cortes, llegando el primer corte a totalizar el 90 % de la producción (De Falco *et al.* 2000) pero siendo, en general, alrededor del 70 % (Delgado *et al.* 2008a). En las condiciones del ensayo, el aporte de riego y el ritmo de cortes intensivos permitieron la realización de hasta 6 cortes, sin lograr por ello equilibrar el reparto de la producción. En el ensayo I, en el cual se realizaron cinco cortes anuales, la proporción del primer corte alcanzó el 47% de la producción total. Delgado *et al.* (2008b), también en condiciones de regadío, llegaron a conclusiones similares, con un primer corte que representó el 67% de la producción anual. Esta estacionalidad de la producción puede representar una adaptación a climas fríos o semiáridos y tiene probablemente una base genética importante ya que no responde a un ritmo de corte más sostenido, ya sea tomando como criterio la altura de las plantas (De Falco *et al.* 2000; Maiorana *et al.* 1995) o su estado fenológico como en el presente trabajo o en el ensayo de pastoreo de Mowrey y Volesky (1993).

El factor ‘corte’ también afectó significativamente a la longitud de la parte aérea, al número de foliolos por hoja y al de inflorescencias. La longitud de la parte aérea fue considerablemente mayor en el primer corte, 50 cm y 60 cm en ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ respectivamente, frente a 20/30 cm en los cortes siguientes. Esta diferencia se debió al elevado desarrollo que tuvieron las plantas en el primer ciclo productivo. El número medio de foliolos por hoja del primer corte fue de 23,3 vs 16,3 en los siguientes. Inversamente, la proporción de hojas se incrementó a partir del tercer (IF) o del cuarto corte (PF y FF) pasando de 0,36 a 0,55 de media.

El número de inflorescencias por planta estuvo también afectado por el corte y experimentó un descenso marcado desde el primer corte, siendo de 8,7 inflorescencias por planta en el primero y descendiendo a una media de 2,3 inflorescencias en los cortes siguientes. Estos cambios apreciados en la morfología de la esparceta, donde se muestra un crecimiento importante en primavera, con plantas florecidas, tallos de peso prominente y hojas con numerosos foliolos, mientras que en verano el crecimiento de las plantas es escaso, con tallos más números y cortos y hojas con menos foliolos, puede constituir una repuesta de las plantas al incremento de temperatura que tiene lugar al pasar de la primavera al verano. En nuestro experimento, hubo un aumento de la temperatura media desde el primer corte de 11,7 °C a 18,3 °C en el segundo corte, siendo 21,7 °C la temperatura media del segundo al ultimo corte.

La producción total de forraje tampoco estuvo afectada por el factor 'variedad', siendo el peso total de la parte aérea producida no significativamente diferente en 'Reznos' y 'Cotswold Common'. 'Cotswold Common' alcanzó mayor producción en el primer corte, como corresponde a su definición como esparceta de un corte, pero luego su producción decayó en los cortes siguientes, igualándose la producción de ambas al final del experimento. La longitud de los tallos, mayor en 'Reznos' que en 'Cotswold Common', se pudo compensar con el mayor número de tallos y foliolos que mostró 'Cotswold Common', características de las variedades de un corte.

#### IV.2 Composición química del forraje

Los diferentes parámetros evaluados que conforman la composición química de la parte aérea estuvieron influenciados muy significativamente por el corte, la variedad y la interacción variedad\*corte y, en menor medida, por el tratamiento; la interacción tratamiento\*variedad no fue significativa.

El contenido en PB fue el único parámetro afectado muy significativamente por el tratamiento, apreciándose un descenso en el contenido, a medida que progresaba la floración; los valores medios obtenidos fueron 15,7 %, 14,9 % y 14,2 % en IF, PF y FF, respectivamente. Dicho descenso se debió casi exclusivamente a las diferencias observadas entre el primer corte y los siguientes. En el primer corte tuvieron valores de 23,1 %, 20,2 % y 16,3 % en IF, PF y FF, respectivamente, y en los siguientes la media fue de 14,5 %. 'Cotswold Common' presentó un contenido medio más elevado que 'Reznos' en el conjunto de los cortes con 16,0 % vs 13,9 %.

En lo que respecta al contenido medio en FND, FAD y LAD, el tratamiento tuvo menor incidencia significativa. Al igual que sucedió en el contenido en PB, pero a la inversa, hubo un incremento importante entre el primer corte y los siguientes, pasando de 30,7 % a 41,5 % en FND, de 20,9 % a 30,5 % en FAD y de 3,4 % a 8,0 % en LAD. 'Reznos' presentó porcentajes más elevados en el conjunto de los cortes que 'Cotswold Common' en FND, 40,8 % vs 37,9 %, y FAD, 29,9 % vs 27,5 % pero menores en LAD, 7,4 % vs 6,7 %.

Las variaciones observadas entre los diferentes tratamientos y cortes fueron un reflejo de los cambios habidos en los parámetros agromorfológicos de las plantas, con un desarrollo importante en el primer corte, de plantas con tallos poco numerosos pero grandes y hojas con muchos foliolos. Las temperaturas suaves habidas hasta el primer corte tuvieron sin duda un efecto preponderante ya que retardaron la senescencia de los tejidos, dado que en las leguminosas de clima templado las temperaturas altas afectan a la actividad fotosintética, al crecimiento y a las relaciones hídricas (Mc Donald y Paulsen 1997).

La fecha del primer aprovechamiento más adecuada para alcanzar el valor nutritivo óptimo ha sido abordada por Carlton *et al.* (1968), Koch *et al.* (1972), Borreani *et al.* (2003) y Delgado *et al.* (2010a). En dichos experimentos se estudió la evolución de la producción y calidad del forraje desde el estado de botón floral hasta la formación de semillas. Los citados autores apreciaron un aumento de la producción y una disminución de la calidad, especialmente del contenido en proteína, con el envejecimiento de la planta, estableciendo que el momento más favorable para realizar el primer corte se localiza entre el inicio de la floración y la plena floración.

El aumento de la producción se atribuyó a la mayor contribución porcentual de los tallos a medida que envejecía la planta, a lo que se añadía la aportación de la masa de inflorescencias. Con la progresión de la floración, la relación hoja/tallo decae rápidamente y, con ello, la pérdida de calidad (Koch *et al.* 1972; Pardo *et al.* 2000; Borreani *et al.* 2003).

En las condiciones del ensayo y con el rango de estados fenológicos en el cual se centra este trabajo, se apreció que la cosecha de forraje presenta una buena calidad. La proporción de hojas, principales contribuyentes del contenido en PB, no experimentó cambios significativos entre dichos estados, coincidiendo con los resultados encontrados por Mowrey y Matches (1991), lo que permite mantener unos parámetros de composición química de las plantas en niveles satisfactorios, al contrario de lo que ocurre en otras leguminosas como la alfalfa donde la calidad del forraje sufre un descenso acentuado durante el periodo de floración.

El contenido en TC no estuvo afectado por el tratamiento, pero si le afectaron muy significativamente tanto la fecha de los cortes como la variedad. El porcentaje de TC aumentó en los cortes de verano, en particular en la variedad 'Cotswold Common' que tuvo los niveles de TC más elevados. Las concentraciones en TC se mantuvieron entre 1,3 % y 3,3 % con una media de 2,7 %, consideradas como moderadas, todo lo cual contribuye a aumentar la calidad nutritiva de los forrajes ya que protegen las proteínas de la degradación ruminal y no disminuyen la ingestión por los animales (Wang *et al.* 2000).

#### **IV.3 Dinámica de las reservas**

El nivel de reservas de AL, AZ y PB, en coronas y raíces estuvo influenciado por el tratamiento, el corte, la variedad, y la interacción corte\*variedad. En general, el nivel de reservas se incrementó a medida que el corte fue menos intensivo, de IF a PF, y a FF. El aumento representó entre IF y FF, el 17 % para el contenido en AL de la corona y el 19 % para el de AZ y, en la raíz, el 23 % para el contenido en AL, el 18 % para el de AZ y 15 % para el de PB.

Las plantas llegaron al primer corte con el mismo manejo en los tres tratamientos, por lo que no presentaron diferencias significativas en contenidos de AL, AZ y PB en coronas y raíces. En el segundo y tercer cortes las plantas de todos los tratamientos estuvieron afectadas por la acción conjunta del corte y del calor, ya que las temperaturas medias sobrepasaron los 24 °C en el momento del corte, cuando las temperaturas altas son un factor de estrés metabólico importante en la esparceta (Kallenbach *et al.* 1996). Es entonces cuando se apreciaron las diferencias entre tratamientos, ya que cuanto más se prolongó el periodo entre cortes más tiempo tuvieron las plantas para reponer sus reservas. En el último corte, se apreció el efecto acumulativo de los sucesivos cortes en cada tratamiento con diferencias significativas en el contenido de la corona en AL del 4,4 % en IF, 5,8 % en PF y 5,6 % en FF, y en AZ del 2,5 % en IF, 3,1 % en PF y 4,2 % en FF; en la raíz, en AZ del 4,8 % en IF, 5,4 % en PF y 7,5 % en FF, y en PB del 10,8 % en IF, 10,4 % en PF y 13,2 % en FF. Es interesante destacar que en el segundo corte las plantas del tratamiento FF tuvieron un nivel de reservas superiores a IF y PF; en el tercer corte, FF superó a IF pero no a PF (salvo para el contenido en AL de la corona) y, en el último corte, FF y PF superaron a IF en contenidos en AL y AZ en la corona, dando lugar a que el nivel de reservas del tratamiento FF fuese más alto que el de IF, y que PF presentase un nivel de reservas no significativamente distinto de FF.

En lo que respecta a las diferencias entre los dos tipos de esparcetas, los contenidos en AL, AZ y PB de la corona y de la raíz fueron superiores en ‘Reznos’ con respecto a ‘Cotswold Common’ en el primer corte de cada tratamiento (salvo en coronas que fueron iguales para AZ en PF1 y FF1, y para PB en IF1, PF1 y FF1; y en raíz para AZ en PF1 y F1), lo que podría deberse a la diferencia de precocidad observada entre ambas variedades. De hecho, ‘Reznos’ fue de media nueve días más tardía que ‘Cotswold Common’ lo que sugiere que las plantas de ‘Reznos’ dispusieron de mayor tiempo para acumular reservas antes del primer corte y que una proporción más elevada de los gastos metabólicos generados por el crecimiento en los nueve días hasta el momento del corte, estuviesen cubiertos por la actividad fotosintética. Por el contrario, ‘Cotswold Common’ tuvo mayor contenido en AL, AZ y PB en coronas y raíces en los cortes centrales, probablemente debido al menor consumo metabólico de ‘Cotswold Common’ en la formación de inflorescencias y flores. En general, el nivel de reservas fue mayor en ‘Cotswold Common’ en la corona en AZ, 3,6 % vs 3,3 %, y PB, 14,3 % vs 12,8 %, pero mayor en ‘Reznos’ en la raíz en AL, 7,5 % vs 5,7 %, y AZ, 5,4 % vs 4,9 %. Estas diferencias podrían atribuirse a la estructura de la corona. La corona es una zona de unión entre los tallos y la raíz y, como tal, incluye la parte basal de los tallos y las yemas durmientes, por una parte, y la parte alta de la raíz, por otra. ‘Cotswold Common’ presentó un número mayor de tallos y de yemas, lo que puede explicar su contenido más elevado.

Numerosos trabajos subrayan el efecto depresor que ocasiona en las leguminosas la eliminación de la parte aérea ya que, a la vez que elimina la biomasa, priva a la planta de su capacidad fotosintética y, como consecuencia, de su capacidad de fijación de nitrógeno (Badoux 1965; Li *et al.* 1996). En este contexto, las reservas de la raíz y corona desempeñan un papel importante en la capacidad de rebrote y persistencia de las plantas (Kim *et al.* 1991; Teixeira *et al.* 2007). Se aprecia que cuando se sobrepasa la frecuencia óptima del aprovechamiento se produce un agotamiento de las reservas, lo que da lugar a una caída de la producción y a una pérdida de persistencia. No obstante, la dinámica de almacenamiento y la composición de las reservas difieren en las leguminosas según las especies, como demostraron Li *et al.* (1996), lo que impide la extrapolación de un género al otro. En el caso de la esparceta la dinámica general de almacenamiento ha sido un descenso desde un nivel de reservas alto en el primer corte al nivel más bajo en el segundo o tercer corte (según tratamientos) antes de recuperarse en los últimos cortes; ello fue patente en el caso en las coronas para AL y en raíces, para AZ. Una dinámica parecida fue observada por Ben Chaâbane (1997) en la mielga, donde el nivel de carbohidratos decrecía en verano para alcanzar su máximo en otoño-invierno.

Mowrey *et al.* (1992), estudiando las razones del menor crecimiento de las plantas en verano, apreciaron que la concentración de carbohidratos en las raíces era más elevada al inicio de la primavera, descendía fuertemente en verano y volvía a ascender en otoño. En nuestras condiciones el descenso estival no fue tan marcado quizás por el aporte adecuado de riego.

El contenido de PB en las raíces tiene un interés particular según algunos autores (Rotili *et al.* 1999; Simon *et al.* 2004) ya que permite, después de un aprovechamiento, desarrollar nuevos brotes hasta que se normaliza la actividad fotosintética, utilizándose los carbohidratos en los procesos respiratorios del sistema durante dicho periodo. La aplicación de un ritmo de corte intensivo, IF, disminuyó en un 15 % el contenido de PB radicular en la esparceta.

En lo que respecta a la caracterización agromorfológica de la corona y raíz, el peso de la corona no estuvo afectado por el tratamiento, pero si por la variedad y el corte, y hubo una interacción significativa tratamiento\*variedad y corte\*variedad.

En concreto, el peso de la corona fue más elevado en ‘Reznos’ con 7,6 g vs 5,0 g que en ‘Cotswold Common’; las diferencias estuvieron más marcadas en PF1 y, sobre todo, en FF1 y FF2, ya que el intervalo entre cortes permitió la emisión de yemas nuevas en ‘Reznos’, que incrementaron el peso de la corona.

La longitud de la raíz no estuvo afectada por el tratamiento ni por la variedad, apreciándose únicamente diferencias entre cortes, siendo en general de menor longitud en el primer corte y estabilizándose en los cortes siguientes. El diámetro y peso de las raíces estuvieron significativamente afectados por el corte, pero sobre todo por la variedad. ‘Reznos’ alcanzó pesos de raíces superiores a ‘Cotswold Common’, 5,6 g y 5,1 g de media, respectivamente. Badoux (1965) observó que el régimen de aprovechamientos afectaba al peso de las raíces; después de cada aprovechamiento, la masa de raíces sufría una disminución del peso y, hasta que no había un cierto crecimiento aéreo, no retomaban activamente su recuperación. En el presente trabajo, los cortes se efectuaron cuando las plantas habían recuperado su masa foliar y alcanzado la floración, estado en el cual la planta se ha recuperado por lo menos parcialmente del corte lo que explica la ausencia de fluctuación de peso de las raíces y coronas.

#### IV.4 Tipificación de las variedades

Las variedades ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’ divergieron tanto en criterios agromorfológicos como en su composición química. En lo que respecta a los criterios agromorfológicos, las plantas de ‘Cotswold Common’ presentaron menor altura (26,4 cm vs 36,8 cm) y mayor número de tallos (7,6 vs 5,9) y proporción de hojas (48 % vs 41 %), y de foliolos (19,1 vs 16,2). En la parte subterránea, ‘Reznos’ destacó por el mayor diámetro de la raíz (9,4 mm vs 8,1 mm), y peso de la raíz (5,6 g vs 5,1 g) y de la corona (6,7 g vs 4,8 g). Todo ello es coincidente con la caracterización de plantas comunes o gigantes llevada a cabo por Michelena y Hycka (1988) y Prospero *et al.* (1994).

Las diferencias agromorfológicas no dieron lugar a diferencias entre variedades a nivel de producción de la parte aérea, al contrario de lo que apreciaron otros autores como Michelena y Hycka (1988), Prospero *et al.* (1994) y Thomson (1951), debido probablemente a la alta densidad de plantas. Las mismas variedades, sembradas en plantas aisladas en el ensayo I, tuvieron diferencias en la producción de MS, siendo la de ‘Reznos’ un 160% superior a la de ‘Cotswold Common’. La densidad fue elegida con el fin de conservar 12 plantas por contenedor. En condiciones de campo, ello equivale a una densidad de 10 plantas por m<sup>2</sup> en el primer año, densidad que en el segundo año se reduce a 5/8 plantas por m<sup>2</sup>. En nuestras condiciones, y a pesar de los cortes realizados en el año de establecimiento, el número de plantas se mantuvo casi constante, resultando, quizás demasiadas para que las plantas del tipo gigante expresaran su pleno potencial.

Las diferencias más relevantes fueron la precocidad y la intensidad de floración. ‘Cotswold Common’ fue más precoz con 4, 14 y 10 días en IF1, PF1 y FF1 respectivamente, lo que coincide con los resultados de Badoux (1965) y Thomson (1951) sobre la mayor precocidad de las esparcetas de un corte. En las condiciones del ensayo, ‘Cotswold Common’ presentó flores únicamente en los dos primeros cortes de cada tratamiento, mientras que ‘Reznos’ floreció en todos cortes salvo en IF6 y PF5.

Al nivel de composición química de la parte aérea, 'Reznos' presentó contenidos más elevados en FND, FAD y LAD entre 7 % y 9 % de media, que 'Cotswold Common' y, consecuentemente, contenidos más bajos en PB (13,6 % vs 16,0 %) y TC (2,3 % vs 3,0 %), lo que se explica por las diferencias observadas entre las dos variedades en la proporción de hojas, dado que las hojas suelen presentar niveles de estos componentes más elevados que los tallos (Jarrige *et al.* 1995). Las diferencias observadas a nivel de composición química entre 'Reznos' y 'Cotswold Common' fueron sobre todo importantes en el primer corte debido a la mayor precocidad de 'Cotswold Common'. El contenido en TC fue superior en 'Cotswold Common' salvo en IF5, PF5 y FF4 que fueron los cortes donde la proporción de hojas alcanzó valores máximos, y se igualaron en las dos variedades. Azuhnwi *et al.* (2010) encontraron asimismo en algunas variedades suizas de tipo común, mayor contenido en PB y TC que en las variedades gigantes Perly y Visnovsky.

En lo que respecta a la parte subterránea se apreció un ratio superior raíz/parte aérea de 'Reznos' frente a 'Cotswold Common'. Pardo *et al.* (2000) observaron resultados similares entre la variedad gigante y la común. El mayor tamaño de la raíz de 'Reznos' supuso mayores capacidades de almacenamiento; ya que los pesos de la corona y de la raíz fueron más elevados; ello es contrario a los resultados de Badoux (1965) quien encontró mayor peso de las raíces en las de un corte que en las de dos cortes. Los contenidos en AL, AZ y PB de la corona y de la raíz fueron superiores (o iguales) en 'Reznos' frente a 'Cotswold Common' en el primer corte de cada tratamiento, lo que podría deberse a la diferencia de precocidad observada entre las variedades. De hecho, 'Reznos' fue de media nueve días más tardía que 'Cotswold Common' lo que sugiere que las plantas de 'Reznos' dispusieron de mayor tiempo para acumular reservas antes del primer corte y pudieron tener una proporción más elevada de los gastos metabólicos generados por el crecimiento, cubiertos por la mayor duración de la actividad fotosintética hasta el primer corte. Por el contrario, 'Cotswold Common' tuvo mayor contenido en AL, AZ y PB en coronas y raíces en los cortes céntricos, probablemente debido al menor gasto energético de 'Cotswold Common' en la producción de inflorescencias y flores.

En general, los contenidos en reservas fueron mayores en 'Cotswold Common' en la corona (AZ, PB), pero mayores en 'Reznos' en la raíz (AL, AZ). Esta diferencia podría atribuirse a la estructura de la corona. La corona es una zona de unión entre los tallos y la raíz y, como tal, incluye la parte basal de los tallos y las yemas durmientes, por una parte, y la parte alta de la raíz, por otra. 'Cotswold Common' presentó un número superior de tallos y de yemas, lo que puede explicar su mayor contenido en AZ (3,6 % vs 3,3 %) y PB (14,3 % vs 12,8 %) en la corona.

## V. CONCLUSIONES

La aplicación de tres intensidades de corte a dos tipos de esparceta, 'Cotswold Common' de un corte y 'Reznos' de dos cortes, con un seguimiento de los parámetros agromorfológicos y de la composición química de las diferentes partes de la planta, permitió relacionar la producción de forraje, su calidad y el estado de reservas, con el fin de determinar el manejo óptimo del cultivo:

La producción del forraje presentó un reparto marcado por una fuerte estacionalidad en todos los tratamientos, representando el primer corte, de media, el 39% de la producción total. No hubo diferencias significativas en la producción total entre tratamientos, ni entre variedades.

Los diferentes tratamientos y cortes ocasionaron cambios significativos en los parámetros agromorfológicos de las plantas, con un desarrollo importante en el primer corte de plantas con tallos poco numerosos pero grandes, hojas con muchos folíolos y abundantes inflorescencias, y una reducción significativa en los restantes cortes de la longitud de la parte aérea, del número de folíolos por hoja y de inflorescencias.

La calidad del forraje se caracterizó por una cierta estabilidad en la composición química entre los tratamientos. La variación media en PB, entre IF y FF, fue solamente de punto y medio, pero el descenso en el primer corte fue más pronunciado, siendo de 23,1 %, 20,2 % y 16,3 % en IF, PF y FF respectivamente.

El contenido en TC no estuvo afectado por el tratamiento, pero muy significativamente por la fecha de corte y la variedad. Las concentraciones en TC se mantuvieron entre 1,3 % y 3,3 % con una media de 2,7 %, siendo el verano y la variedad 'Cotswold Common' donde se presentaron los niveles de TC más elevados.

El nivel de reservas de Al, AZ y PB, en coronas y raíces estuvo influenciado por el tratamiento, el corte y la variedad. En general, el nivel de reservas descendió en verano y se incrementó en otoño, en mayor medida cuanto menos intensivo fue el corte. Ello supuso una diferencia en el último corte del 17 % entre IF y FF para el contenido en AL de la corona y 19 % para el de AZ, y el 23 % para el contenido en AL radicular, 18 % en AZ y 15 % en PB. En lo que respecta a las diferencias entre los dos tipos de esparcetas, las reservas fueron superiores en 'Reznos' en el primer corte de cada tratamiento.

Las variedades expresaron diferencias morfológicas en función de su pertenencia al tipo de uno o dos cortes. 'Cotswold Common' presentó de media con respecto a 'Reznos', en todos los cortes, menor altura de tallos, 26,4 cm vs 36,8 cm, y mayor proporción de hojas, 48 % vs 41 %, número de tallos/planta, 7,6 vs 5,9, y folíolos/hoja, 19,1 vs 16,2. En lo que respecta a la parte subterránea, 'Reznos' destacó con respecto a 'Cotswold Common' por el mayor diámetro de la raíz, 9,4 mm vs 8,1 mm, peso de la raíz, 5,6 g vs 5,1 g, y de la corona, 6,7 vs 4,8 g.



Las variedades también divergieron por su composición química siendo, en la parte aérea, el contenido de 'Cotswold Common' mayor en PB, 16,0 % vs 13,9 %, LAD, 7,4 % vs 6,7 %, y TC, 3,0 % vs 2,3 %. En la parte subterránea, 'Cotswold Common' destacó por su contenido en la corona de AZ, 3,6 % vs 3,3 %, y PB, 14,3 % vs 12,8 %; 'Reznos', por su parte, mostró mayor capacidad de almacenamiento y contenido de reservas radiculares de AL, 7,5 % vs 5,7 %, y AZ, 5,4 % vs 4,9 %.

Por ello, si estos resultados se confirman, puede concluirse que un corte en estado de plena floración constituye un compromiso ideal ya que permite mantener cierta calidad de forraje y de reservas en ambos tipos de esparceta.

## VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alibes X, Rodríguez J, Gueria R, Muñoz F (1979). Valor alimenticio de la esparceta (*Onobrychis viciaefolia* Scop.). *Pastos* 9: 81-84.
- Azuhnwi B, Thomann B, Arrigo Y, Boller B, Hess H, Kreuzer M, Dohme F (2010). Effect of spatial and temporal variation in concentration of condensed tannins in different sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) accessions on in situ ruminal degradation kinetics of dry matter and crude protein. *agroscope.admin.ch*.
- Badoux S (1965). Etudes des caractères morphologiques, physiologiques et agronomiques de populations d'esparcette (*Onobrychis* sp). *La recherche en Suisse* 4: 111-190.
- Ben Chaâbane A (1997). Tesis: Estudio de la manifestación del carácter rizomatoso en la mielga (*Medicago sativa* L.) en función del manejo del cultivo. Universitat de Lleida, Lleida. 273 pp.
- Borreani G, Peiretti PG, Tabacco E (2003). Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) in the spring growth cycle. *Agronomie* 23: 193–201.
- Buyse J, Merxk R (1993). An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *Journal of Experimental Botany* 44: 1627-1629.
- Carlton A, Cooper C, Delaney R, Dubbs A, Eslick R (1968). Growth and forage quality comparisons of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agronomy Journal* 60: 630–632.
- De Falco E, Landi G, Basso F (2000). Production and quality of the sainfoin forage (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) as affected by cutting regime in a hilly area of southern Italy. *Cahiers Options Méditerranéennes* 45: 275–279.
- Delgado I, Andrés C, Muñoz F (2008a). Effect of the environmental conditions on different morphological and agronomical characteristics of sainfoin. *Options Méditerranéennes* 79: 199-202.
- Delgado I, Andrés C, Muñoz F (2008b). Effect of the environmental conditions on different morphological and agronomical characteristics of sainfoin. *Cahiers Options Méditerranéennes* 79: 199-202.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoun S (2010a). Caracterización y valor nutritivo de diferentes estados fenológicos de la esparceta. En: IV Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes, Zamora - Miranda do Douro. 247-252.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoun S (2010b). Evolution of the feeding value of sainfoin as affected by the phenological development. En: 13th meeting for Mediterranean Forage Resources (FAO), Alicante, España.
- Goering HK, Van Soest PJ (1970). Forage fiber analysis. En: USDA-ARS Agriculture Handbook. Ed. United States Government Printing Office, Washington, DC. 20 pp.
- Helrick K (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Arlington. 703 pp.
- Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C (1995). Les herbivores ruminants. En: Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion. Ed: Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce M, Journet M. INRA Editions, Paris, Francia. 1-24 pp.
- Kallenbach R, Matches A, Mahan J (1996). Sainfoin regrowth declines as metabolic rate increases with temperature. *Crop Science* 36: 91–97.

- Kim T, Ourry A, Boucaud J, Lemaire G (1991). Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (*Medicago sativa* L. following removal of shoots. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 593-602.
- Koch DW, Dotzenko AD, Hinze GO (1972). Influence of Three Cutting Systems on the Yield, Water Use Efficiency, and Forage Quality of Sainfoin1  
10.2134/agronj1972.00021962006400040016x. *Agron. J.* 64: 463-467.
- Li R, Volenec JJ, Joern BC, Cunningham SM (1996). Seasonal Changes in Nonstructural Carbohydrates, Protein, and Macronutrients in Roots of Alfalfa, Red Clover, Sweetclover, and Birdsfoot Trefoil  
10.2135/cropsci1996.0011183X003600030016x. *Crop Sci.* 36: 617-623.
- Maiorana M, Giorgio DD, Rizzo V (1995). Harvest time and cutting height in pure perennal meadows. *Cahiers Options Méditerranéennes* 12: 63-66.
- Mc Donald GK, Paulsen GM (1997). High temperature effects on photosynthesis and water relations of grain legumes. *Plant and Soil* 196: 47-58.
- Michelana A, Hycka M (1988). Diferenciación y caracterización de dos tipos de esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) cultivada en España. *Invest Agrar: Prod Prot Veg* 3: 285-290.
- Mowrey D, Matches A (1991). Persistence of sainfoin under different grazing regimes. *Agronomy Journal* 83: 714-716.
- Mowrey D, Matches A, Preston R (1992). Technical note: utilization of sainfoin by grazing steers and a method for predicting daily gain from small-plot grazing data. *Journal of Animal Science* 70: 2262-2266.
- Mowrey DP, Volesky JD (1993). Feasibility of grazing sainfoin on the southern great plains. *J. Range Manag.* 46: 539-542.
- Pardo A, Falco ED, Franchi ASD (2000). Dynamics of shoot and root growth and adaptation to the environment of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop) in a hilly area of southern Italy. *Cah. Opt. Mediterr.*
- Porter LJ (1989). Tannins. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Ed: Dey PM, Harborne JB. Academic Press Inc, San Diego, USA. 389 – 341 pp.
- Prosperi JM, Demarquet F, Angevain M, Mansat P (1994). Evaluation agronomique de variétés de pays de sainfoin (*Onobrychis sativa* L.) originaires du sud-est de la France. *Agronomie* 14: 285-298.
- Rotili P, Gnocchi G, Scotti C, Zannone L (1999). Some aspects of breeding methodology in alfalfa. En: IX Eucarpia *Medicago sativa* Group Meeting, Kompolt, Hungria. 5-33.
- SAS (2004). Ed: SAS OnlineDoc® 9.1.3, NC, USA.
- Shenk JS, Westerhaus MO (1991). Population definition, sample selection and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 31: 469-474.
- Simon JC, Jacquet A, Decau ML, Goulas E, Le Dily F (2004). Influence of cutting frequency on the morphology and the C and N reserve status of two cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.). *European Journal of Agronomy* 20: 341-350.
- Teixeira EI, Moot DJ, Mickelbart MV (2007). Seasonal patterns of root C and N reserves of lucerne crops (*Medicago sativa* L.) grown in a temperate climate were affected by defoliation regime. *European Journal of Agronomy* 26: 10-20.
- Thomson J (1951). Sainfoin in its first harvest year. *Grass and Forage Science* 6: 107-117.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Wang Y, Douglas GB, Waghorn GB, Barry TN, Foote AG, Purchas RW (2000). Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and lucerne (*Medicago sativa*). *Journal of Agricultural Science* 126: 87-98.



## **Ensayo IV: Biología reproductiva de la esparceta**

### **I. OBJETIVOS**

La finalidad del ensayo ha sido iniciar el estudio de la biología reproductiva de la esparceta, abordando la descripción morfológica de la flor, la descripción y cinética de su desarrollo, la caracterización de la fase progámica y el estudio del nivel de autocompatibilidad en esta especie.

Ello se ha llevado a cabo mediante:

1. La observación de la inflorescencia y de la flor en sus fases de desarrollo.
2. La determinación del periodo de receptividad estigmática.
3. La determinación del momento de la anthesis y del periodo de vida del grano de polen.
4. El estudio de la cinética de la fase progámica.
5. La comprobación de la posible existencia de un sistema de autoincompatibilidad.

### **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **II.1 Localización, condiciones físicas del ensayo**

El ensayo se realizó en la finca del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, con la misma colección de variedades utilizadas en el ensayo I, durante mayo y junio de 2009 y mayo, junio y julio de 2010. La localización exacta del ensayo y sus parámetros físicos se presentan en el párrafo II.1 del ensayo I.

#### **II.2. Material vegetal**

El momento de la anthesis se determinó en las 23 variedades de la colección de esparcetas. El periodo de receptividad estigmática, de viabilidad del polen y el estudio de la cinética de la fase progámica se determinaron en muestras de varias plantas que pertenecían a un mínimo de cinco variedades distintas. Por último, el seguimiento de inflorescencias, así como la comprobación de una posible autoincompatibilidad, se realizó en dos variedades representativas de los tipos de uno y dos cortes, 'Cotswold Common' y 'Reznos'.

#### **II.3. Procesado de las muestras**

##### **III.3.1. Obtención del polen**

Salvo mención contraria, el polen se recogió de flores en estado de 'quilla saliendo'. Se observó que en este estado las flores están todavía cerradas pero ya tienen el polen dehiscido. El polen se separó de las anteras tamizándolo a través de una criba con poro de 0,26 mm y se conservó en botes de cristal a 4 °C hasta su utilización. La polinización se efectuó empleando un pincel fino, que se esterilizó entre cada muestra.

### III.3.2. Observación con la lupa y el microscopio

Los distintos estados de las flores y su macromorfología fueron observados utilizándose una lupa binocular Leica MZ16 (Leica Microsystems, Westlar, Alemania) asociada a una cámara Leica DC 300.

Para observar el estado del estigma, la presencia de granos de polen o la formación y crecimiento de tubos polínicos, se colocaron los pistilos, entre portaobjetos y cubreobjetos, en una solución de azul de anilina al 0,1 % (v/v) en  $\text{PO}_4\text{K}_3$  0,1 N. El azul de anilina permite resaltar la callosa, un polímero de glucosa  $\beta$ -(1-3) que se acumula a intervalos en el tubo polínico a medida que crece (Linskens y Esser 1957). Las muestras se observaron con un microscopio Leica DM2500 de epifluorescencia con el filtro A (filtro excitado BP 340-380 y filtro bloqueador LP 425) asociado con una cámara Canon PowerShot S50. Dado que los pistilos de la esparceta son pequeños y se aplastan con facilidad, se optó por la observación directa en azul de anilina sin etapa de cocción previa con sulfito sódico, tal como se indica en la bibliografía para otras especies con pistilos más grandes como el melocotonero (Herrero y Arbeloa 1989).

## II.4. Diseño experimental

### II.4.1 Desarrollo de la floración

Para conocer la evolución de la floración en campo, se hizo el seguimiento de dos variedades de esparceta, ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’, del tipo “un corte” y “dos cortes” respectivamente. El seguimiento se hizo a escala de la inflorescencia y a escala de la flor. En plantas adultas se seleccionaron 10 inflorescencias, principales y secundarias, del primer brote. Las inflorescencias se marcaron y numeraron para su posterior identificación. Se seleccionaron tres flores por inflorescencia respectivamente de la parte basal, media y apical de la espiga; para ello se utilizó hilo de cobre. El seguimiento de las inflorescencias se realizó cada tres días, anotándose el número de flores y su estado. Las flores se controlaron cada dos horas, desde su apertura al cierre. Los distintos estados de las inflorescencias fueron determinados basándose en la escala de estados fenológicos establecida por Delgado *et al.* (2010):

1. Estado ‘botón floral’: Aparición de los primeros botones verdes.
2. Estado ‘inicio de floración’: Al menos dos-tres flores abiertas.
3. Estado ‘plena floración’: Al menos el 50% de las flores abiertas.
4. Estado ‘final de floración’: Flores abiertas únicamente en la parte superior.
5. Estado ‘cáliz hinchado’: Aparición de primeras vainas formadas en la base de la inflorescencia.
6. Estado ‘semilla verde’: Sólo vainas verdes en la inflorescencia, las flores ya han desaparecido.
7. Estado ‘semilla seca’: Vainas virando a marrón.

Los estados fenológicos de las flores se definieron tras el seguimiento de las mismas.

Con el fin de evaluar posteriormente una posible autogamia en las distintas variedades, se observó en una población de 230 flores, procedentes de 23 variedades distintas, el estado en el cual dehiscen las anteras y la posición relativa del estigma y de las anteras.

#### **II.4.2 Prueba de mantenimiento de flores en laboratorio**

Para determinar si podían utilizarse flores cortadas en el ensayo, se realizó el siguiente preensayo. Flores en distintos estados ('botón colorado precoz', 'botón colorado tardío', 'quilla saliendo precoz', 'quilla saliendo tardía'), definidos previamente según el apartado anterior, fueron colocadas en espuma de floristería previamente embebida con agua. Diez flores por estado, aisladas y dotadas de pecíolo, fueron clavadas en la espuma; con intervalos de una hora, se anotó el estado de cada flor. Se realizó la misma prueba dejando las flores unidas a una porción de tallo de una longitud de 8 cm.

Paralelamente se realizó una prueba para evaluar la receptividad estigmática de flores conservadas en condiciones de laboratorio. Para ello las flores, antes de la dehiscencia de las anteras, fueron seleccionadas y castradas con la ayuda de pinzas. La quilla y el estandarte se quitaron para dejar el fascículo del androceo (anteras quitadas) y el estilo expuesto. Se evaluó el estado del estigma de diez flores, cada hora, mediante observación directa al microscopio con azul de anilina al 0,1 %. Los distintos estados del estigma se clasificaron entre rojo cerrado, rojo abierto, blanco cerrado y blanco abierto. Veinte flores se polinizaron al día siguiente y al cabo de 24 horas se evaluó el estado del estigma, la presencia de polen adherido, la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico.

#### **II.4.3 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo**

Se realizó un seguimiento de flores, desde su apertura al cierre, con la finalidad de conocer la secuencia natural de la receptividad estigmática en campo desde el momento de llegada del polen, la germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos. Para ello se marcaron, con esmalte de uñas, ochenta flores recién abiertas de cinco plantas. Diez flores, dos por planta, se muestrearon a las 17h del día 0 y el día 1 cada dos horas, de las 9h a las 21h. Se hicieron anotaciones datos del estado del estigma, el número de granos de polen adheridos, germinados o con tubos polínicos y nivel de progresión del tubo polínico. El seguimiento se realizó en dos fechas, 09/06/10 y 10/06/10.

#### **II.4.4 Secuencia de la fase progámica en campo, con polinización controlada**

Para conocer la duración de la fase progámica en campo, se marcaron y castraron flores de cinco plantas y las inflorescencias se embolsaron con velo de horticultura a las 17h. Al día siguiente se polinizaron a las 9h con polen alógamo. Los muestreos se realizaron sobre diez flores, cada dos horas, desde el momento de la polinización hasta las 20h. Un último muestreo posterior se realizó el tercer día a las 9h. Se observó la presencia de granos de polen, su germinación y el crecimiento de los tubos polínicos.

#### **II.4.5 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo, con polinización controlada**

Con el fin de conocer cuando las flores adquirían y perdían la receptividad estigmática, se realizó un ensayo en campo polinizando flores en distintos tiempos. Un total de 80 flores en estado de 'quilla saliendo' fueron marcadas, castradas y embolsadas al día 0 y al día siguiente (día 1); un día después (día 2) se polinizaron 10 flores, cada vez, a las 9h, 13h o 17h. Diez flores adicionales fueron polinizadas antes de las antesis y otras diez justo después de la antesis (comprobada con flores sin castrar marcadas a la vez).

Después de la polinización, las flores fueron embolsadas de nuevo. Se observó la presencia de granos de polen, su germinación y el crecimiento de los tubos polínicos al cabo de 24h.

#### **II.4.6 Viabilidad del polen y puesta a punto del método de fluorescencia**

Se puso a punto la técnica fluorométrica de diacetato de fluoresceína (FDA) para determinar la viabilidad del polen para esta especie (Heslop-Harrison 1977). El principio de la técnica se basa en que solamente las células vivas disponen de las esterasas que disocian el compuesto en fluoresceína. Por otra parte, solo las células vivas regulan su permeabilidad plasmática y no dejan salir la fluoresceína que, al no poder escapar, confiere luminescencia a los granos de polen vivos; el ratio entre granos de polen luminosos y granos de polen oscuros permite una estimación de la viabilidad del polen.

##### **II.4.6.1 Concentración de fluoresceína**

Con el fin de ajustar la cantidad de diacetato de fluoresceína a aportar, se realizó una prueba previa con soluciones de 3,5 %, 4,5 % o 5,5 % de diacetato de fluoresceína en 10% de sacarosa. El polen de flores en estado de ‘quilla saliendo’ (flores cerradas con polen ya dehiscente) se obtuvo de varias plantas, elegidas al azar, y se esparció sobre una gota de la solución colocada en un portaobjeto. Se observaron cinco portaobjetos para cada concentración, y de cada portaobjeto tres campos, o hasta contar un mínimo de cien granos de polen. Se anotaron el número total de granos y la proporción de granos de polen vivos.

##### **II.4.6.2 Tiempos de medición**

Dado que en el test de viabilidad con diacetato de fluoresceína se dispone de un tiempo limitado para hacer las lecturas, se determinó el periodo de tiempo disponible para la observación de las muestras tras la observación de un mismo campo a intervalos regulares de 15 minutos, desde  $T_0$  hasta que se desvanece la fluorescencia de la muestra. Se anotaron el número total de granos y la proporción de granos vivos.

##### **II.4.6.3 Hidratación previa del grano de polen**

La viabilidad de granos de polen, procedentes de flores en estados de ‘quilla saliendo’, de cinco plantas, fue comprobada directamente o tras una hidratación previa en atmósfera húmeda durante una hora. Para ello, se colocó el polen en un recipiente abierto colocado en otro recipiente cubierto, el cual se forró con papel absorbente húmedo. Diez minutos después de ponerse en contacto con una solución de diacetato de fluoresceína al 5,5 % y sacarosa al 10 %, se observaron para cada concentración cinco portaobjetos y de cada portaobjeto tres campos o hasta contar un mínimo de cien granos de polen. Se anotaron el número total de granos y la proporción de granos de polen vivos.

##### **II.4.6.4 Concentración de sacarosa**

El ajuste de la concentración de sacarosa se realizó ensayando con concentraciones de 0 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 15 g/l y 20 g/l de sacarosa con 5,5 % de diacetato de fluoresceína. Se midieron al cabo de diez minutos la proporción de polen vivo y el número total de granos de polen en cinco portaobjetos y tres campos por portaobjetos.



#### **II.4.6.5 Viabilidad del polen: Pruebas de germinación**

La estimación de la viabilidad del polen se realizó mediante pruebas de germinación del polen. Con este fin se elaboraron geles de sacarosa al 10% con 1% de agarosa sobre portaobjetos, formando geles de 2mm\*4cm\*2cm. El polen se esparció sobre la superficie del gel y se dejó germinar a temperatura ambiente, en cada caja, con humedad mantenida con papel absorbente húmedo. Se realizaron varias pruebas con distintas muestras de polen (todas por encima del 30% de viabilidad), de las cuales se hizo un seguimiento a intervalos regulares, hasta 24h, mediante el conteo de los granos germinados con microscopio de luz visible.

#### **II.4.6.6 Viabilidad del polen a lo largo del día**

Se evaluó la viabilidad de granos de polen dehiscentes en distintos momentos del día, recogiendo polen de flores en estado de ‘quilla saliendo’ a las 9h, 12h, 16h y 20h. Para ello, polen de veinte flores procedentes de diez plantas fue recuperado y mezclado antes de su utilización.

Tras hidratación en atmósfera saturada durante una hora y diez minutos, en contacto con una solución de diacetato de fluoresceína a 5,5 % y 10 % de sacarosa, el polen fue observado al microscopio de fluorescencia. Se observaron, cada hora, cinco portaobjetos y de cada portaobjetos tres campos o hasta contar un mínimo de cien granos de polen. Se anotaron el número total de granos y la proporción de granos de polen vivos.

#### **II.4.6.7 Viabilidad del polen tras el desarrollo de la flor**

Con el mismo procedimiento que en el II.4.6.6, se evaluó la viabilidad del polen de flores en distintos estados fenológicos correspondientes a ‘quilla saliendo’, ‘flor recién abierta’, ‘flor abierta madura’ y ‘flor marchita’. Para conseguir polen en flores ya abiertas, se cubrieron inflorescencias enteras de diez plantas con bolsas de velo de horticultura. Se recogió el polen de un mínimo de dos flores de cada una de las diez plantas y se mezcló antes de su observación.

#### **II.4.7 Estimación del nivel de autocompatibilidad efectiva en campo**

Con el fin de evaluar la posible autogamia, se introdujeron tres tallos de 15 plantas en bolsas de velo de horticultura. Cada tallo llevaba un mínimo de tres inflorescencias, con una media de 70 flores por inflorescencia, lo que supuso un mínimo de 500 flores embolsadas por planta. Las bolsas se colocaron antes del inicio de floración de la inflorescencia y se recogieron en estado de ‘semilla seca’. A la vez se marcaron tres inflorescencias fuera de la bolsa en cada planta como testigos. Se contó el número de semillas producidas en cada inflorescencia embolsada y en el testigo; a continuación, las semillas se pesaron y se calculó el ratio entre peso de las semillas resultantes de la autopolinización y las flores expuestas a polinización abierta. Por término semilla se entendió al lomento, semilla *sensus stricto* y a la cascarilla. Con el fin de evaluar si puede haber diferencias entre variedades al nivel de autogamia, el ensayo se repartió entre 15 variedades distintas.

#### **II.4.8 Seguimiento del crecimiento de tubos polínicos con auto y alopolinización en campo**

Para conocer si el crecimiento de los tubos polínicos es igual en auto y alopolinización, se seleccionaron en campo dos plantas de variedades distintas. El día 0 a las 17h, veinte flores de cada planta se castraron en estado de ‘botón colorado’ (anterior a la antesis) y se embolsaron

con velo de horticultura. A la vez se recogió polen de cada una de las plantas y se conservó en frasco de cristal hermético hasta el día siguiente.

El día 1, diez flores de cada planta se polinizaron con su propio polen, la otra mitad con polen procedente de otra planta. Las flores se volvieron a embolsar durante 24h, transcurrido el cual se muestrearon para su observación. Se anotó el estado del estigma, la presencia de polen, su nivel de germinación y el crecimiento de los tubos polínicos. La misma operación se realizó por triplicado.

#### **II.4.9 Estimación del nivel de autocompatibilidad con polinización controlada en campo**

Se repitió la misma operación que en el II.4.8 con la diferencia de que en lugar de recogerse al cabo de 24h las flores se recogieron al cabo de un mes, en cuanto llegaron al estado de 'semilla seca'.

#### **II.5 Análisis estadísticos**

Cuando el volumen de datos lo permitió, aquéllos se procesaron mediante análisis de la varianza en base a un modelo con un solo factor.

La relación entre la viabilidad del polen y la temperatura o la higrometría se estudió mediante regresión simple.

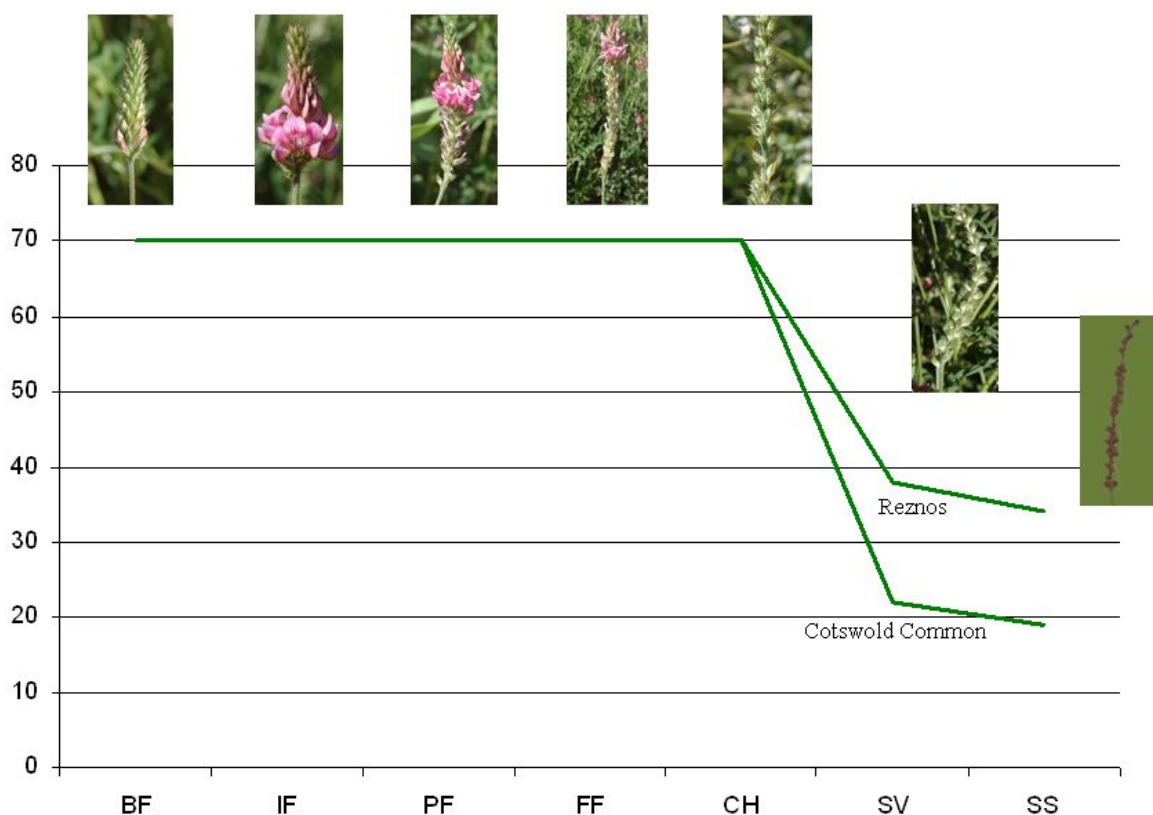
Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (SAS 2004).

### III RESULTADOS

#### III.1 Desarrollo de la floración

El seguimiento de la floración de la esparceta se realizó a nivel de la inflorescencia y de la flor de la planta. Las inflorescencias seleccionadas el 17/04/09 en estado de ‘botón floral’ alcanzaron el estado de ‘semilla seca’ el 25/05/09, 38 días más tarde. La escala fenológica establecida por Delgado (2010) permitió determinar el estado de la inflorescencia de manera rápida y precisa. Sin embargo, la existencia de un periodo de 18 días entre los estados ‘final de floración’ y ‘semilla verde’ (Delgado *et al.* 2010), hizo necesario añadir otro estado fenológico, el de ‘cáliz hinchado’, para describir la fase en la cual la inflorescencia inicia la formación de las semillas. La **Figura III.1.a** muestra la evolución de órganos (botones, flores o semillas) por inflorescencia a lo largo de su desarrollo fenológico. Como se puede apreciar, las dos variedades tuvieron una cantidad inicial de botones idéntica, con una media de 70 botones. Esta cifra se mantuvo hasta el estado de ‘cáliz hinchado’, donde las inflorescencias de las dos variedades experimentaron la mayor pérdida de flores. Hubo otro descenso, menos marcado, entre el estado de ‘semilla verde’ y de ‘semilla seca’.

Las dos variedades sufrieron esta pérdida en los mismos periodos; sin embargo, el nivel de cuajado no fue igual entre ‘Cotswold Common’ y ‘Reznos’, con 27,1 % frente a 48,6 % respectivamente. No hubo diferencias significativas entre inflorescencias secundarias y principales en términos de números de órganos o de nivel de cuajado; este último fue homogéneo en la inflorescencia (ausencia de diferencias entre parte basal y apical).



**Figura III.1.a** Evolución del número de flores o frutos por inflorescencia de las esparcetas ‘Reznos’ y ‘Cotswold Common’ en estado de botón floral (BF), inicio de floración (IF), plena floración (PF), final de floración (FF), cáliz hinchado (CH), semilla verde (SV) y semilla seca (SS).



**Figura III.1.b** Estados de desarrollo de la flor de esparceta, variedad ‘Cotswold Common’ (barra = 500  $\mu$ m).

El seguimiento de las flores requirió una escala de nueve estados fenológicos, basada en cambios en la morfología (**párrafo II.4.1 y Figura II.1.b**).

1. Botón verde: La corola está pálida y no sobresale de los sépalos.
2. Botón colorado: La corola sobresale de los sépalos.
3. Quilla saliendo: La flor tiene un color rosa, la quilla se asoma por debajo del estandarte; en este estado, las anteras han dehiscido.
4. Flor abierta: La flor está abierta.
5. Flor marchita: La flor se ha cerrado y la corola forma una masa indistinta; en estado precoz, la observación del pistilo es todavía posible.
6. Cáliz: La corola se ha caído, la vaina no sobresale de la parte fusionada del cáliz.
7. Cáliz hinchado: La vaina no sobresale de los sépalos.
8. Semilla verde: La vaina sobresale de los sépalos o tiene su tamaño definitivo, la semilla está aún verde.
9. Semilla seca: La semilla y la vaina tienen un color amarillo o marrón claro.

Desde el estado de ‘botón verde’, transcurrieron aproximadamente 21 días para llegar al estado ‘semilla seca’. La duración de los distintos estados fue muy variable, desde 5 días para el estado de ‘semilla verde’, a menos de un día para el estado de ‘carena saliendo’.

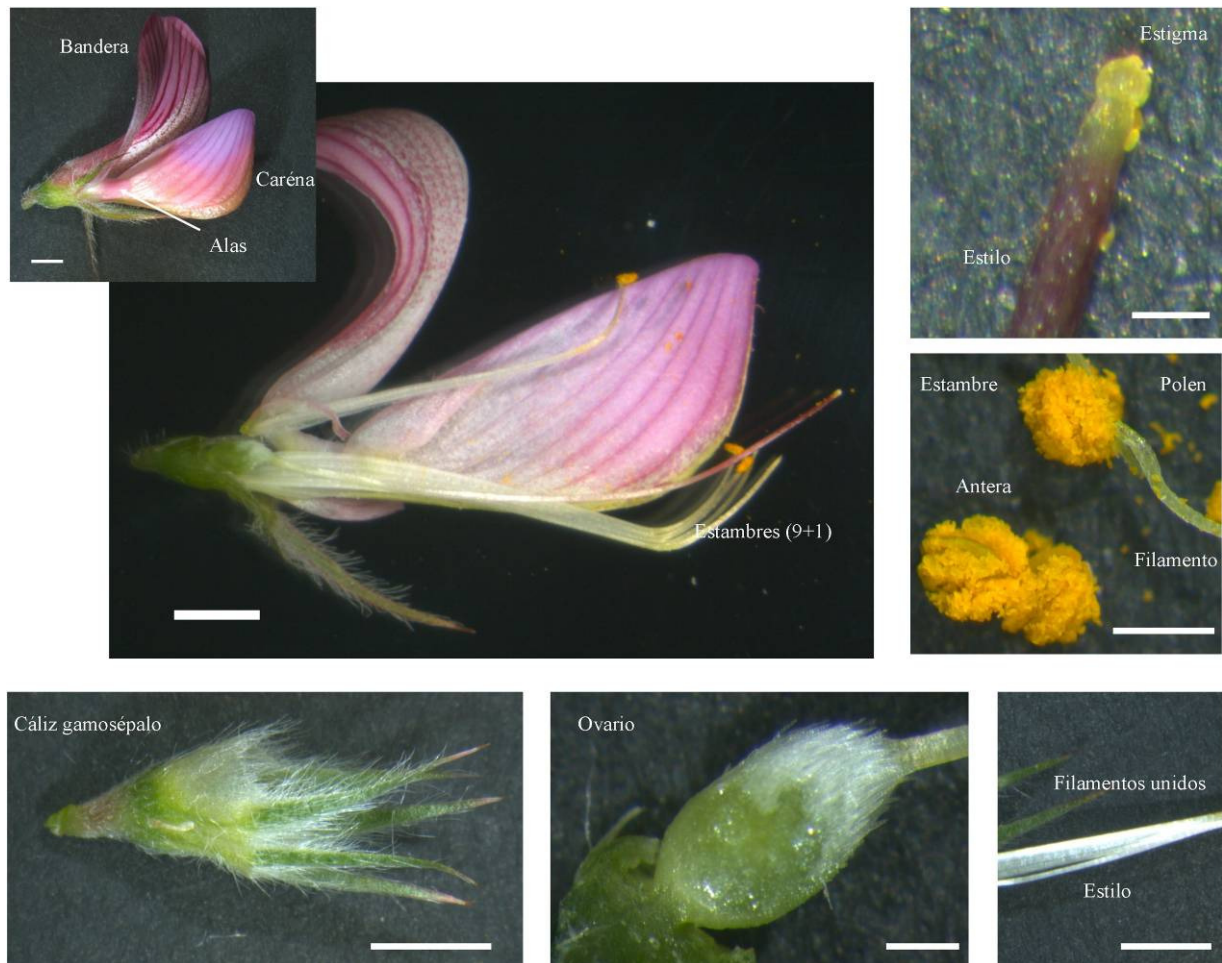
La maduración de las flores fue un proceso continuo, que se desarrolló desde la base de la inflorescencia. En el caso de las flores abiertas hubo generalmente dos estratos distintos, siendo las del estrato bajo más antiguas que las del de arriba. La flor permaneció aproximadamente 24h abierta, pero esta duración se vio afectada por la temperatura, que aceleró su senescencia. Así, según el momento de apertura de la flor (por la mañana, al final de la tarde o por la noche) y las condiciones climáticas, la flor permaneció abierta de 12h a 30h. Con fin de homogeneizar las muestras estudiadas, se trabajó, salvo indicación contraria, con flores en estado de ‘quilla saliendo’ a las 17h, lo que corresponde a flores abiertas después de las 20h y con una esperanza de vida abierta de 24h.

Se observó que las anteras dehiscieron en estado de ‘quilla saliendo’. En este estado, el pistilo que se encontraba inicialmente por debajo de las anteras, ha proseguido su crecimiento y se sitúa entonces alrededor de 1mm por encima de las anteras.

No se observaron diferencias entre variedades a nivel del desarrollo de las flores o de su ritmo.

En el estado de ‘cáliz hinchado’, una proporción de las flores cayeron, mientras las otras engrosaban. Es el estado en el cual se manifiesta externamente el cuajado inicial en la esparceta.

La **Figura III.1.c** presenta la morfología de la flor abierta de la esparceta, fase en la cual se realiza la polinización.



**Figura III.1.c** Morfología floral de la esparceta: vista general y corte longitudinal (barra = 2 mm) y detalle del estigma (barra = 250  $\mu$ m), de las anteras (barra = 250  $\mu$ m), del estilo (barra = 2 mm), del ovario (barra = 250  $\mu$ m) y del cáliz (barra = 250  $\mu$ m).

### III.2 Prueba de mantenimiento de flores en laboratorio

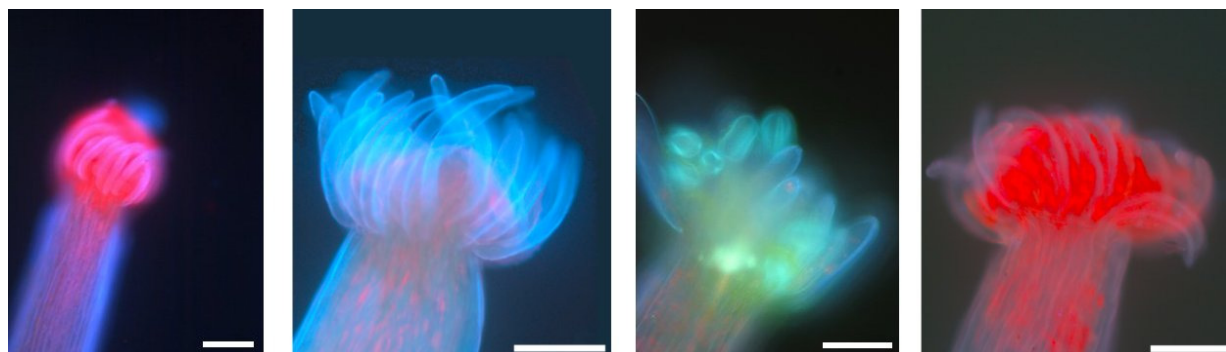
Se comprobó la posibilidad de mantener flores en condiciones de laboratorio, colocadas en espuma de floristería. Para ello, se recogieron flores en los estados de 'botón colorado precoz' y 'tardío', y 'quilla saliendo precoz' y 'tardía'. Se realizó la prueba con flores con pecíolos o con flores con pecíolo y un trozo de tallos. Las flores en estado de 'quilla saliendo' tuvieron un desarrollo similar a las flores *in vivo*, se abrieron al cabo de cuatro a seis horas y permanecieron abiertas cerca de 24h. Las flores en estado de 'botón colorado tardío' permanecieron menos tiempo abiertas, alrededor de 12 a 14h y el 40% de flores en estado de 'botón floral precoz' no se abrieron. Los resultados fueron similares entre flores colocadas en la espuma con pecíolo o con pecíolo y tallo.

La adquisición de la receptividad estigmática de flores en condiciones de laboratorio se comprobó mediante la observación regular de los estigmas de flores castradas antes de la dehiscencia de las anteras y por la observación de flores polinizadas artificialmente. El 60 % de las flores no presentó nunca estigma receptivo. En el caso de polinizaciones controladas, se observaron granos de polen adheridos, pero germinaron solo en el 20 % de los casos.

Ante estos resultados, se priorizó el uso de muestras procedentes directamente del campo, frente a las conservadas en condiciones de laboratorio.

### III.3 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo

El seguimiento de la receptividad estigmática se vio facilitado por dos características de la esparceta; por una parte, los tejidos frescos presentaron una fluorescencia fuerte y eran blandos, permitiendo su observación directa sin cocción y, como consecuencia, esto acortó el tiempo entre la recolección de la muestra y su observación. Por otra parte, las largas papilas estigmáticas cambiaron de disposición, con la adquisición de la receptividad, de forma de puño cerrado a abierto (**Figura III.3.a**). Se observaron cuatro tipos de estigma: rojo cerrado (estado precoz no receptivo), blanco cerrado, blanco abierto y rojo abierto en estigmas degradados.



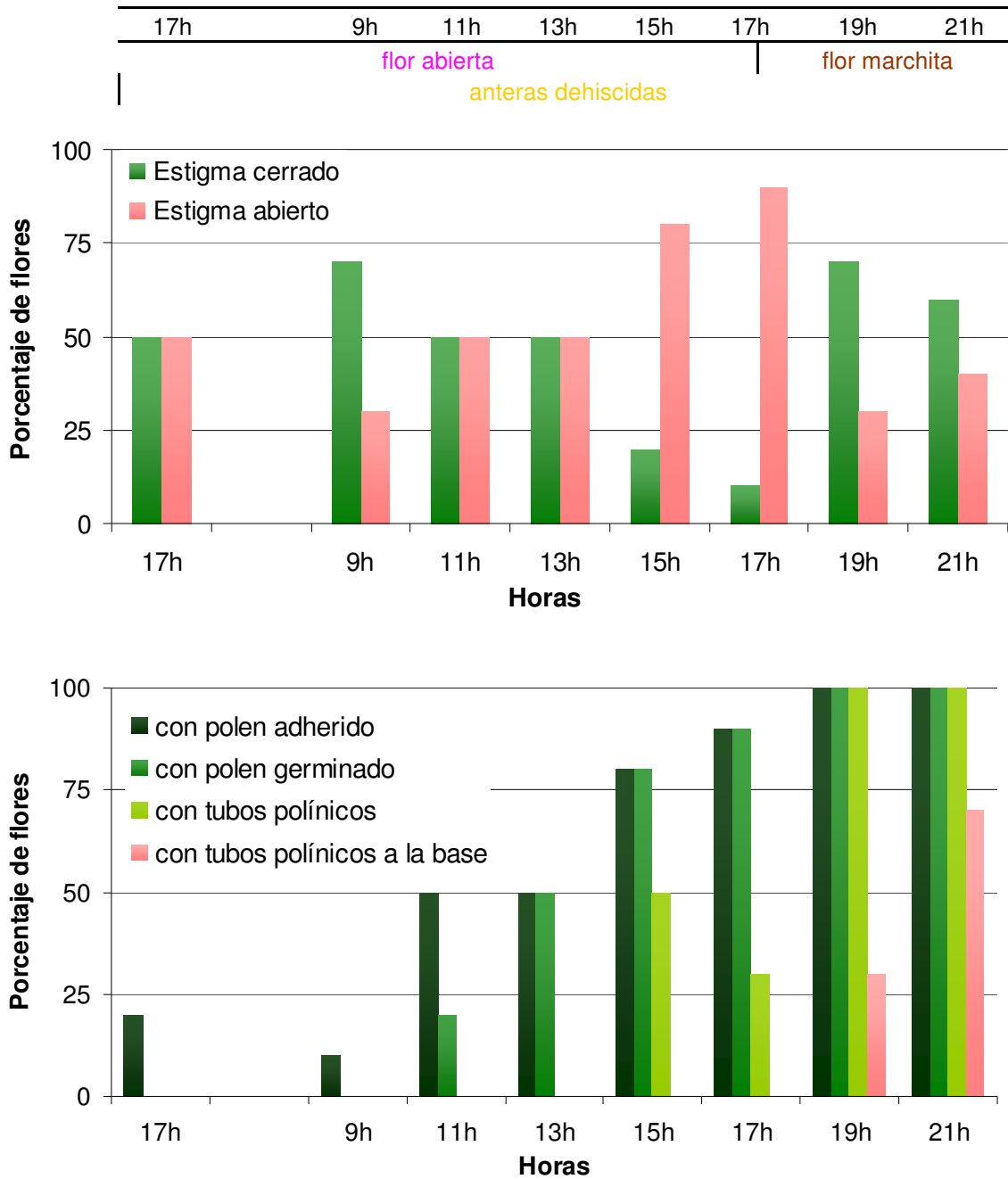
**Figura III.3.a** Estilos de flores abiertas de esparceta, de izquierda a derecha: con papilas estigmáticas cerradas y rojas, con papilas cerradas y blancas, con papilas abiertas y blancas (con granos de polen adheridos y penetración de los tubos polínicos) y con papilas abiertas y rojas (tinción azul de anilina, barra = 100  $\mu\text{m}$ )

La **Figura III.3.b** resume las cuantificaciones de este seguimiento. Como se deduce del estado de la flor, las flores presentaron anteras dehiscidas desde el inicio del seguimiento.

Se observaron granos de polen adherido en proporción importante, desde las 11h; sin embargo, hubo que esperar a las 15h para ver los primeros tubos polínicos atravesar el tejido transmisor. A partir de las 19h, asomaron los primeros tubos polínicos en la base. A las 21h, el 70% de las flores presentaron tubos polínicos en la base.

En el momento de la apertura de la flor, todas las flores no se encontraron con los estigmas en el mismo estado de desarrollo; mientras que el 50 % se encontraban ya abiertos, otro 50 % estaban todavía cerrados. Esta situación permaneció durante la noche y la mañana del día siguiente. Sin embargo, a partir de las 13h la proporción de estigmas abiertos aumentó sensiblemente hasta las 17h, cuando el 90 % de los estigmas estuvieron abiertos. La maduración del estigma continuó su curso hasta las 21h donde sólo un 40 % de los estigmas permanecieron abiertos.

El comportamiento del polen acompañó al desarrollo del estigma. En el momento de apertura de la flor, durante la noche y en la mañana siguiente, una pequeña proporción de estigmas fueron capaces de provocar la adhesión del polen, pero la germinación no fue aparente hasta las 11-13h. El porcentaje de estigmas con polen germinado aumentó a lo largo de la tarde hasta las 19h cuando el 100 % de los estigmas ya tenían polen germinado. El crecimiento del tubo polínico prosiguió rápidamente y los primeros estilos con tubos polínicos se observaron a las 15h; a las 21h el 70 % de los estilos tenían tubos polínicos en la base.

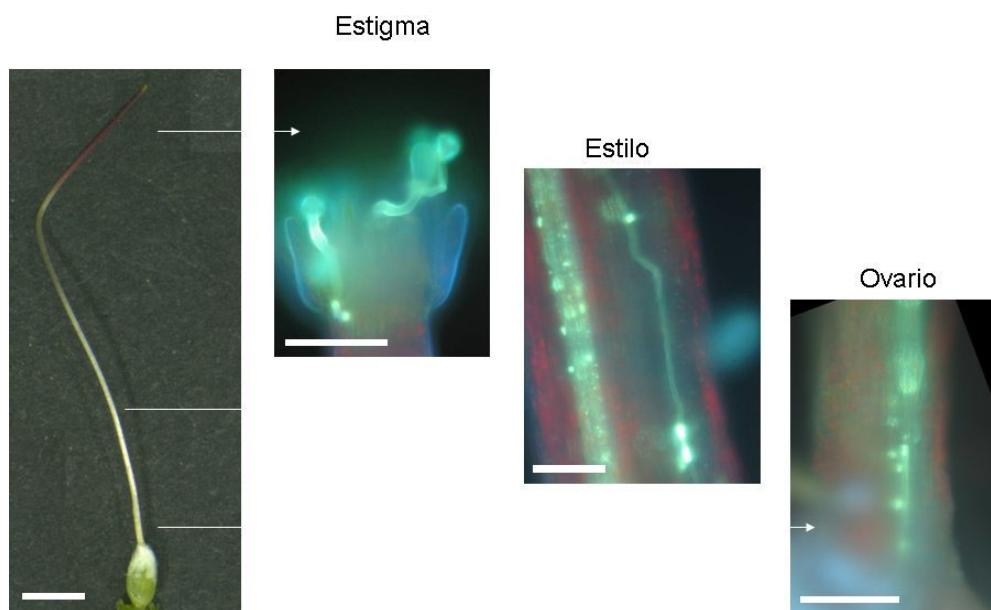


**Figura III.3.b** Evolución de la receptividad estigmática en flores de esparceta en condiciones de campo: estado de la flor, de las anteras, del estigma, presencia de granos de polen adheridos o germinados, y presencia y nivel de desarrollo de los tubos polínicos.



### III.4 Secuencia de la fase progámica en campo, con polinización controlada

Los granos de polen germinan en el estigma, crecen en el estilo y llegan al ovario (**Figura III.4.a**).

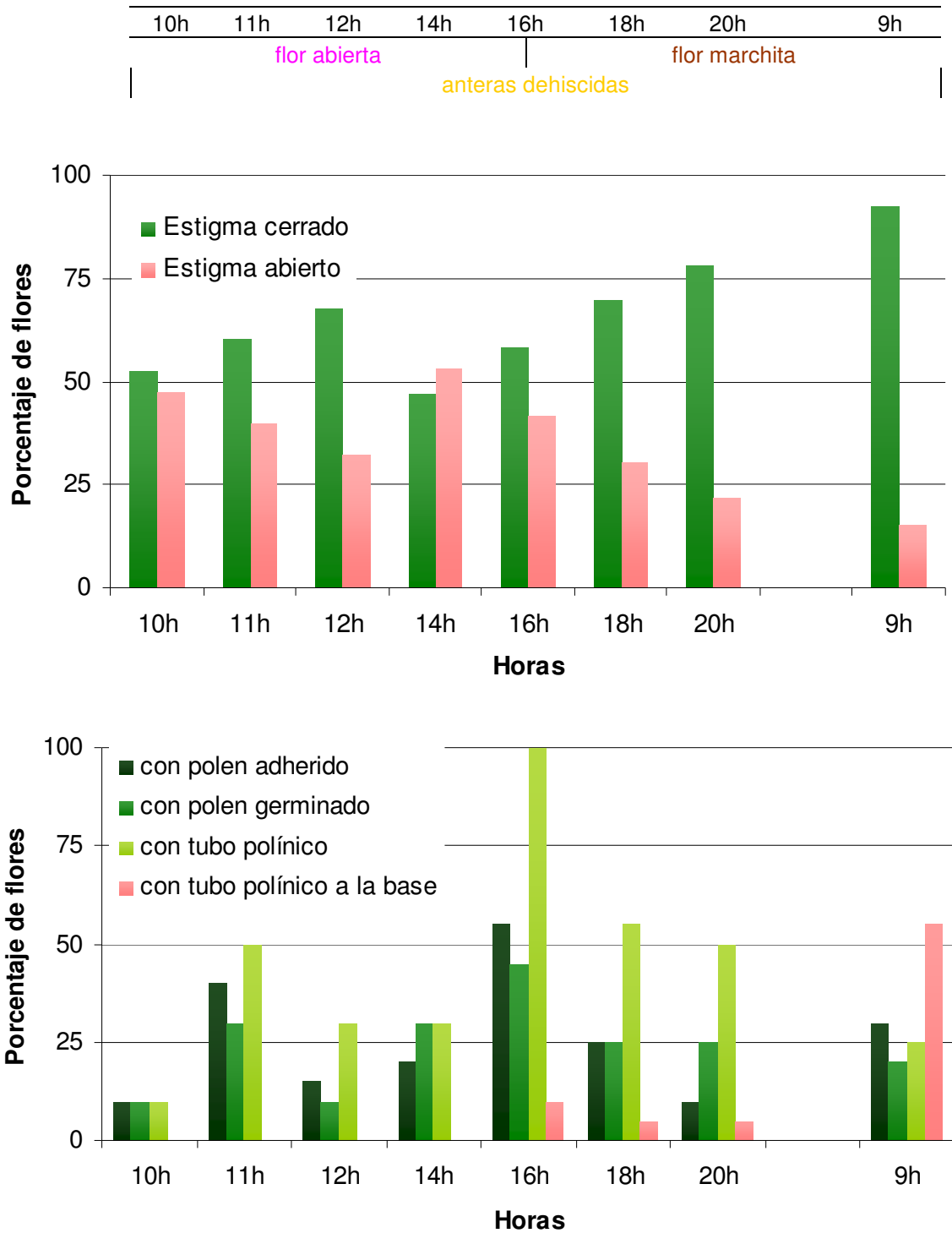


**Figura III.4.a** Gineceo de esparceta (barra = 2 mm) con detalles del estigma, estilo y ovario, con tubos polínicos penetrando el estilo y creciendo hasta el ovario (tinción azul de anilina, barra = 50 µm)

El proceso de castrar flores y polinizarlas el día siguiente, a las 9h, permitió determinar el periodo de tiempo al cabo del cual se produce la germinación del polen, la formación de los tubos polínicos o su crecimiento. La **Figura III.4.b** resume los resultados obtenidos.

El nivel de receptividad estigmática fue relativamente constante de las 10h a las 16h, culminando a las 14h con 53 % de flores con estigmas en estado receptivo. La presencia de polen adherido osciló entre el 10 % y el 55 % de las flores observadas, siendo similares los porcentajes de flores con polen germinado. A las 16h se observó un 100 % de flores con tubos polínicos y la primera aparición de tubos polínicos en la base. Sin embargo, el porcentaje de flores presentando tubos polínicos en la base se mantuvo bajo el primer día, entre el 5 % y el 10 %, para aumentar al 55 % al día siguiente, a las 9h.

La observación de un porcentaje más elevado de estilos con tubos polínicos que con granos de polen germinados, se debió a que el grano de polen una vez germinado no permaneció mucho tiempo visible, al contrario que el tubo polínico, el cual realiza un largo camino en el estilo.



**Figura III.4.b** Evolución de la receptividad estigmática tras el desarrollo de las flores de esparceta en condiciones de campo: estado de la flor, de las anteras, del estigma, presencia de granos de polen adheridos o germinados, y presencia y nivel de desarrollo de los tubos polínicos.

### III.5 Seguimiento de la receptividad estigmática en campo con polinizaciones controladas

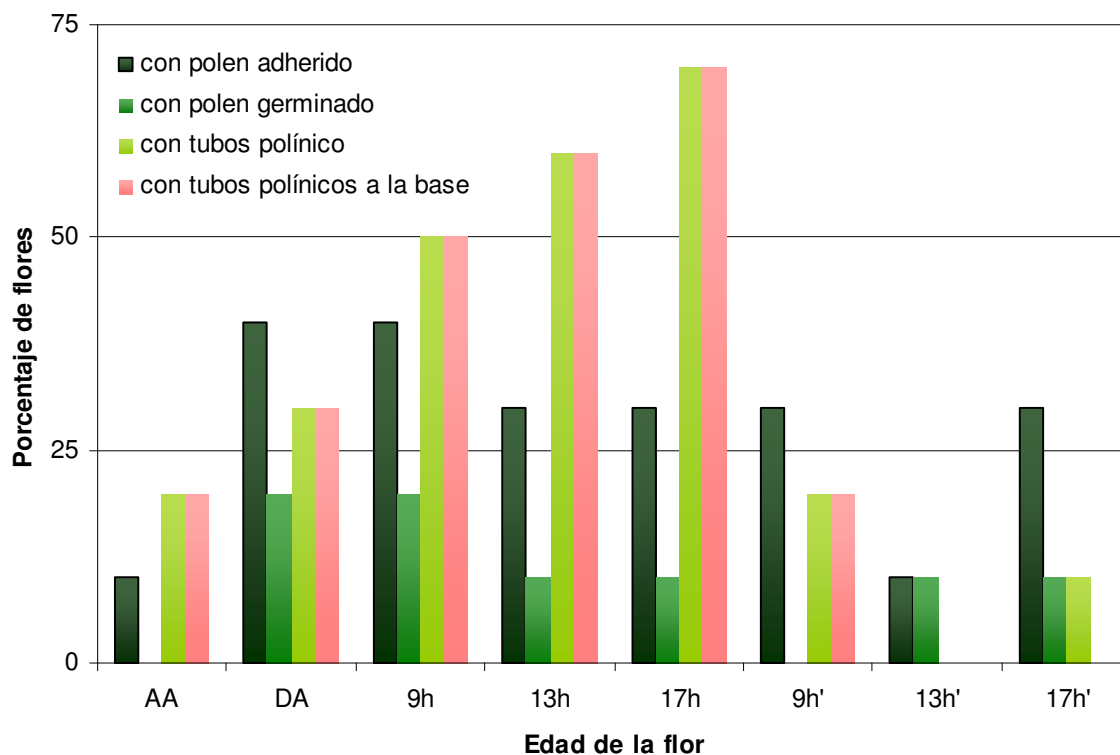
La polinización controlada de flores en distintas fases de su desarrollo mediante castración de las flores, aislamiento del polen y polinización manual (**Figura III.5.a**), permitió establecer el momento óptimo de polinización. Se realizaron polinizaciones antes de la antesis, después de la antesis y a lo largo de dos días, lo que supuso cuatro polinizaciones en estado de ‘flor abierta’ y tres en estado de ‘flor marchita’.

En las flores polinizadas antes de la antesis y al segundo día a las 9h, no se observó polen germinado, pero, sin embargo, hubo presencia de polen adherido, y en el 20 % de las flores, tubos polínicos en la base del estilo (**Figura III.5.b**).



**Figura III.5.a** Flores de esparceta preparadas para polinización controlada. Las flores seleccionadas en la inflorescencia son castradas y embolsadas.

La receptividad estigmática fue evidente en las flores polinizadas después de la antesis, en las que se pudieron observar todas las fases de desarrollo del grano del polen; sin embargo, fue en las flores polinizadas el primer día, en las que se encontraron los mayores niveles de flores presentando tubos polínicos en la base, desde el 50 % a las 9h al 70 % a las 17h. Al día siguiente, la receptividad estigmática descendió claramente y las últimas muestras, polinizadas el segundo día a las 13h y 17h, mostraron una degeneración avanzada del estilo y no se observaron tubos polínicos en la base.

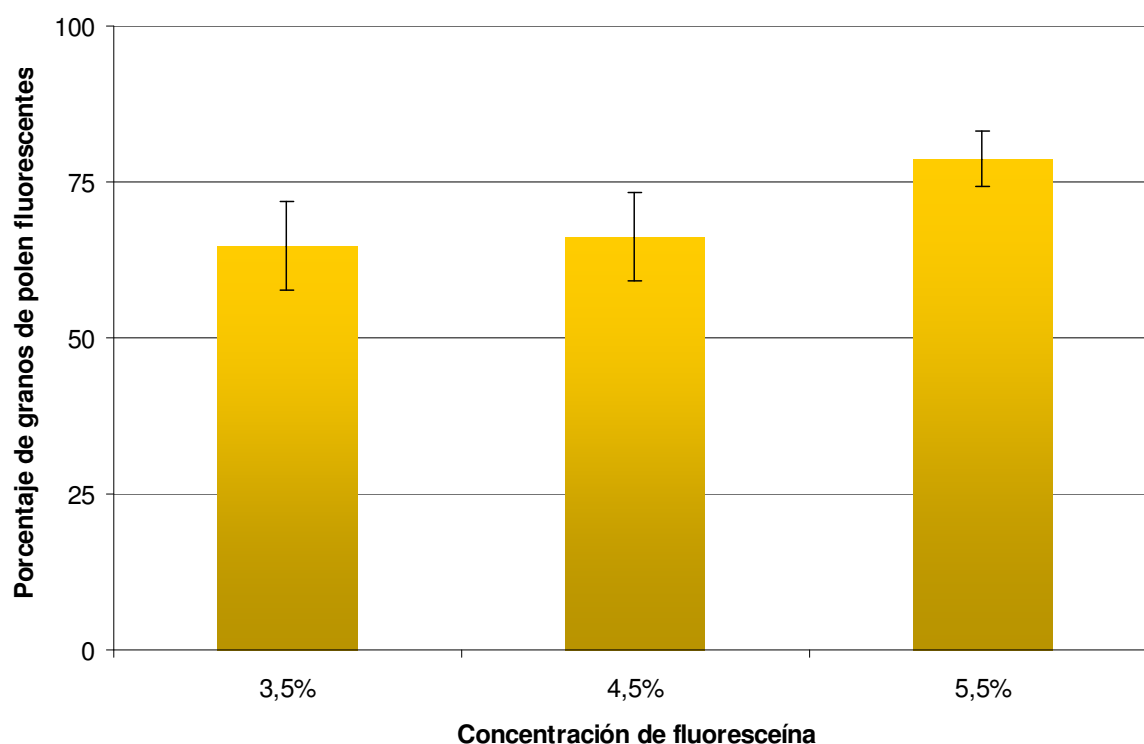


**Figura III.5.b** Evolución de la receptividad estigmática en flores de esparceta en condiciones de campo. Valoración del comportamiento del estigma polinizado a mano antes de la antesis, (AA), después de la antesis, (DA) y a distintas horas, en los dos días siguientes, mediante la presencia de granos de polen adheridos o germinados, y la presencia y nivel de desarrollo de los tubos polínicos.

## III.6 Viabilidad del polen y puesta a punto del método de fluorescencia

### III.6.1 Concentración de fluoresceína

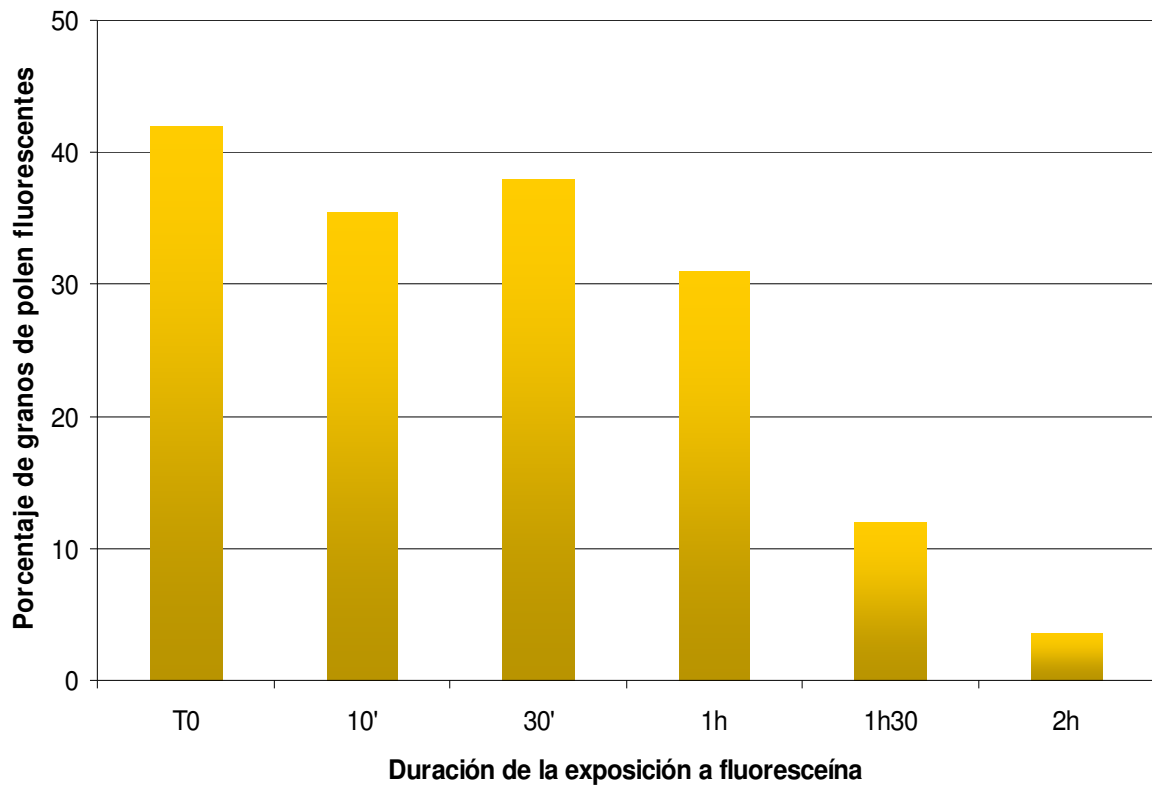
El efecto de una concentración creciente de fluoresceína sobre la viabilidad de los granos de polen se comprobó en flores en estado de ‘quilla saliendo’. La **Figura III.6.1** resume los resultados. No hubo diferencias significativas entre concentraciones de 3,5 % y 4,5 %, pero la concentración de 5,5 % obtenida en un conteo de células fluorescentes fue significativamente elevada ( $P = 0,008$ ). Concentraciones superiores al 5,5 % indujeron un menor contraste entre el medio y las células y, como consecuencia, el conteo fue menos riguroso en estas concentraciones.



**Figura III.6.1** Viabilidad del polen de esparceta medida por la concentración de fluoresceína.

### III.6.2 Tiempos de medición

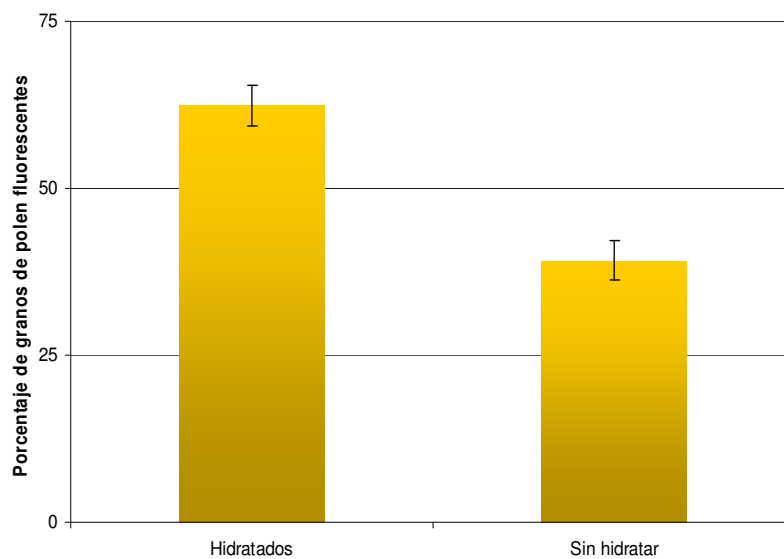
La fluorescencia de las células tendió a desaparecer con el tiempo. Con el fin de minimizar el número de falsos negativos, se realizó un seguimiento del número de células fluorescentes de un mismo campo en varios tiempos. Como se aprecia en la **Figura III.6.2**, el número de células fluorescentes disminuyó drásticamente después de una hora, pasando de 31,2 % a 12,0 % entre 1h y 1h30. Las mediciones realizadas durante los treinta primeros minutos del seguimiento presentaron niveles comprendidos entre 35,5 % y 41,9 %.



**Figura III.6.2** Viabilidad del polen de esparceta por según la duración de la exposición a fluoresceína.

### III.6.3 Hidratación previa del grano de polen

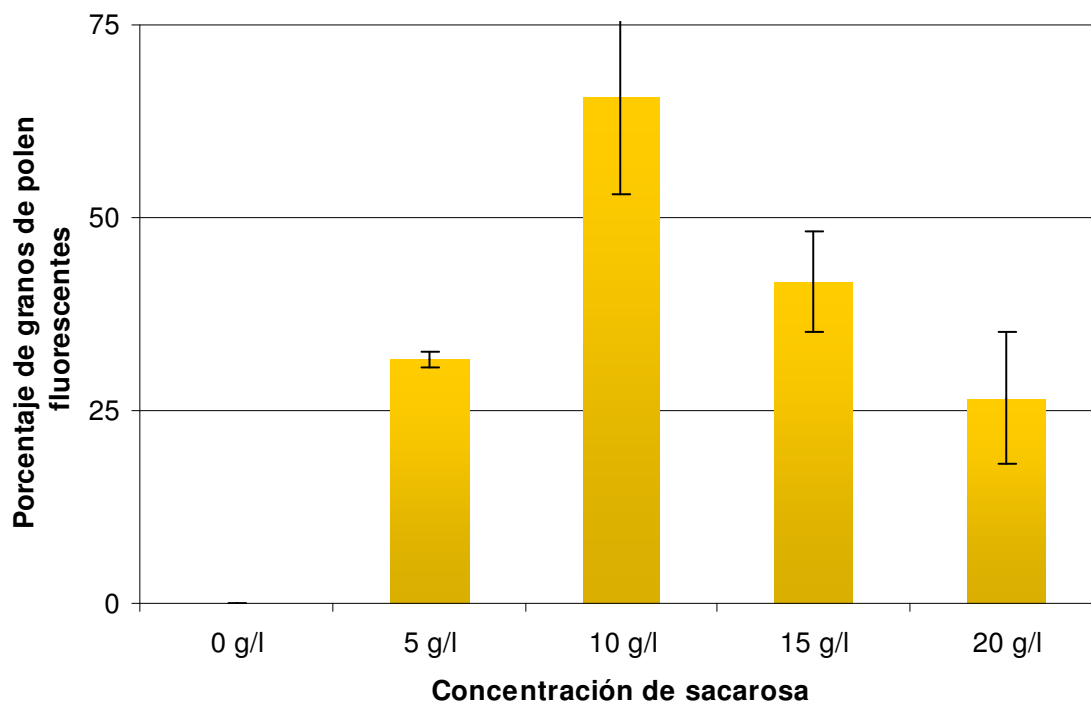
La hidratación previa de los granos de polen en atmósfera saturada dio como resultado un aumento significativo del número de células fluorescentes, pasando del 39,2 % al 62,4 %.



**Figura III.6.3** Viabilidad de polen de esparceta, hidratado y sin hidratar.

### III.6.4 Concentración de sacarosa

La presión osmótica, inducida por la concentración de sacarosa, tuvo un claro efecto sobre la viabilidad de los granos de polen. La carencia de sacarosa en el medio conllevó la muerte de todas las células. Concentraciones crecientes produjeron una curva en campana de Gauss con un máximo correspondiendo a una concentración de 10 g/l, significativamente más elevada que el resto ( $P < 0,001$ ).



**Figura III.6.4** Viabilidad de polen de esparceta según la concentración de sacarosa.

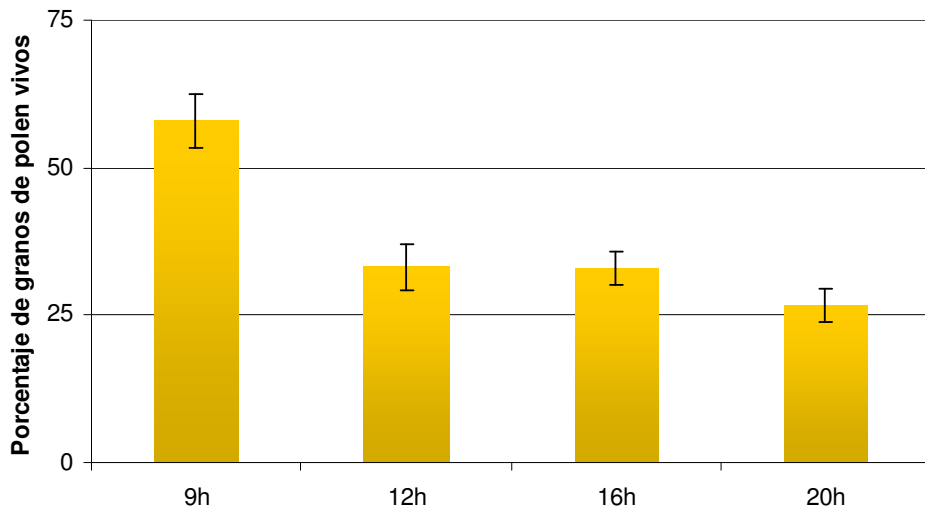
### III.6.5 Viabilidad del polen: pruebas de germinación

Las pruebas de germinación, realizadas siguiendo el mismo procedimiento que en otras especies, en sacarosa al 10 % y agar al 1 %, dieron un nivel de germinación muy bajo y errático, por lo cual, se adoptó la estimación de la viabilidad de polen, mediante el método de la fluorescencia.

### III.6.6 Viabilidad del polen a lo largo del día

El seguimiento de la viabilidad de polen recién dehiscente a diferentes horas del día se resume en la **Figura III.6.6**. La viabilidad fue máxima a las 9h con una proporción del 58% de células fluorescentes vs 30,9 % en las mediciones efectuadas a las 12h, 16h y 20h, que no divergieron entre ellas.

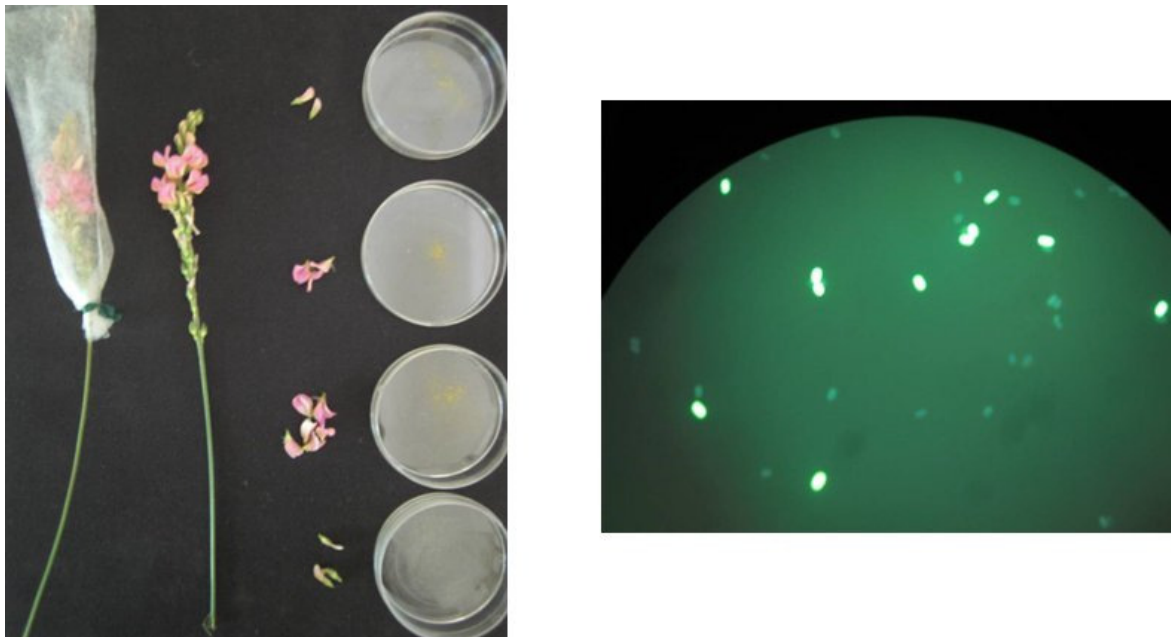
La viabilidad estuvo significativamente relacionada ( $y = 34,3 - 0,21*x$ ;  $r = 0,76$ ) con la temperatura del intervalo de tres horas precedentes la hora de recogida, las cuales fueron respectivamente 20,2 °C, 25,7 °C, 30,5 °C y 28,8 °C a las 9h, 12h, 16h y 20h, así como con la higrometría ( $y = 12,41 + 0,86*x$ ;  $r = 0,78$ ), con higrometrías del 67,6 %, 50,3 %, 35,3 % y 20,8 % a las mismas horas, respectivamente.



**Figura III.6.6** Viabilidad de polen de esparceta a lo largo del día.

### III.6.7 Viabilidad del polen a lo largo del desarrollo de la flor

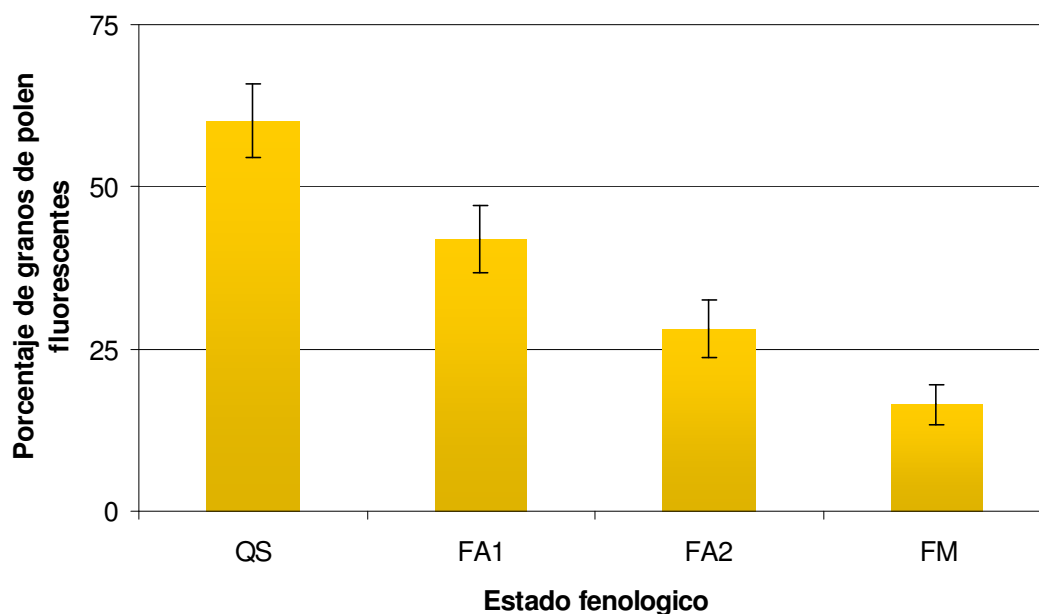
La viabilidad del polen procedente de flores en estados fenológicos de ‘quilla saliendo’, ‘flor recién abierta’, ‘flor abierta madura’ y ‘flor marchita’ se estimó mediante el método de la fluorescencia (**Figura III.6.7.a**).



**Figura III.6.7.a** Flores de esparceta en distintos estados fenológicos (izquierda) para la estimación de la viabilidad del polen por el método de la fluorescencia (derecha).

La viabilidad del polen tuvo un descenso significativo ( $P < 0,001$ ) al avanzar el desarrollo fenológico de la flor, siendo del 60,2 %, 42,0 %, 28,1 % y 16,4 % de polen viable en los estados de ‘quilla saliendo’, ‘flor recién abierta’, ‘flor abierta madura’ y ‘flor marchita’, respectivamente (**Figura III.6.7.b**).





**Figura III.6.7.b** Viabilidad del polen de esparceta a lo largo del desarrollo fenológico de la flor.

### III.7 Estimación del nivel de autocompatibilidad efectiva en campo

El aislamiento de flores de esparceta con bolsa de velo de horticultura permitió establecer el cuajado de fruto en ausencia de vectores externos, ya fuera polen procedente de la misma inflorescencia o planta o de otras plantas. Los resultados de cuajado de quince variedades se presentan en la **Tabla III.7**.

**Tabla III.7** Cuajado de flores de variedades de esparceta en autopolinización natural (auto) en flores embolsadas o mediante polinización abierta (testigo) y peso relativo de las semillas auto/testigo.

	N° de flores embolsadas	Cuajado testigo (%)	Cuajado auto (%)	Ratio peso semillas auto/testigo
Cotswold C.	770	15,2	2,1	0,6
Esparcette	980	25,2	0,8	0,9
Ambra	630	29,5	0,3	1,0
Ucrania	560	21,4	2,5	0,9
Yubileyna	1470	35,7	0,0	
Selección 1	840	31,4	1,1	1,4
Reznos	910	38,1	0,7	1,2
Mezquita de J.	840	42,4	0,0	
Graus	630	24,8	2,3	1,3
Torrecilla de C.	1050	32,5	0,4	0,9
Armenia	1120	20,0	0,6	1,2
Rusia	980	32,4	0,5	1,0
Visnovsky	1050	28,3	0,1	1,4
Selección 2	1400	19,0	2,7	1,2
Selección 2	980	21,2	2,2	1,1
Media	947,3	27,8	1,1	1,1

Del casi un millar de flores que fueron embolsadas por variedad, solamente un promedio del 1,1 % produjo semillas. En función de las variedades, esta cifra osciló entre 0 % y 2,7 %; la ausencia absoluta de fructificación se observó en dos variedades. Los niveles de cuajado en flores autopolinizadas o en polinización abierta estuvieron negativamente correlacionados,  $r = 0,73$ .

El ratio entre el peso de semillas producidas por autopolinización y semillas resultantes de polinización abierta fue el 1,1 % de media.

### III.8 Seguimiento del crecimiento de tubos polínicos con auto y alopolinización en campo

La polinización controlada de flores previamente castradas con polen procedente de la misma planta, produjo 48,3 % de flores con tubos polínicos en la base, en autopolinización, y 63,3 % cuando se hizo la polinización cruzada (**Tabla III.8**). La diferencia observada no fue significativa.

**Tabla III.8** Porcentaje de flores de esparceta con tubos polínicos en la base en auto y alopolinización. M, O, E, F, L, C: denominaciones de plantas.

	Autopolinización		Polinización cruzada	
Planta M	50 %		M*O	60 %
Planta O	40 %		O*M	30 %
Planta E	60 %		E*F	60 %
Planta F	20 %		F*E	60 %
Planta L	50 %		L*C	70 %
Planta C	70 %		C*L	100 %
Media y DE	48,3 %	7,0 %		63,3 % 9,2 %

### III.9 Estimación del nivel de autocompatibilidad en el caso de polinización controlada en campo

El porcentaje de semillas producidas por autopolinización o polinización cruzada fue de 15,5 % y 11,3 %, respectivamente, sin que hubiese diferencias significativas entre los dos tratamientos (**Tabla III.9**).

**Tabla III.9** Porcentaje de semillas con auto o alopolinización en la esparceta.

	Autopolinización		Polinización cruzada	
Planta 1	14,3 %			12,5 %
Planta 2	16,7 %			10,0 %
Media y DE	15,5 %	1,7 %		11,3 % 1,8 %

## IV DISCUSIÓN

### IV.1 Secuencia de la floración y de la fase progámica

La esparceta es apreciada por su prolongado periodo de floración, periodo que sustenta a toda una fauna de insectos y aves (De Jaime Lorén 2008). De hecho, en nuestro experimento cada inflorescencia tardó más de un mes en completar su desarrollo desde el estado de ‘botón verde’ al de ‘semilla seca’. Durante este periodo las inflorescencias pasaron por diferentes estados según la escala propuesta por Delgado *et al.* (2010), a la que se añadió un estado intermedio, el de ‘cáliz hinchado’ que se pudo definir. Los resultados muestran dos periodos en el desarrollo de la flor. El primer periodo tiene lugar desde la antesis hasta el estado de ‘cáliz hinchado’; en él, todas las flores, polinizadas o no, evolucionan de manera similar. En este momento, las flores no polinizadas detienen su crecimiento y en su mayoría caen, bien en este mismo estado o en estado de ‘semilla verde’. A partir de este estado se inicia el engorde de las semillas cuajadas.

En las dos variedades estudiadas, el nivel de cuajado fue distinto siendo mayor el número de semillas en ‘Reznos’ que en ‘Cotswold Common’, cuando el número de flores inicial fue el mismo. Esta diferencia pudo deberse a una diferencia de eficacia en el proceso reproductivo o a una limitación del cuajado, en relación con la reservas energéticas de las plantas. En el ensayo III, ‘Cotswold Common’ tuvo tendencia a una menor flexibilidad en la gestión de las reservas radiculares, lo que podría haber influido en el nivel de cuajado.

La vida de las flores abiertas fue de 24h; se observó una apertura continuada de flores a lo largo del día, pero con una mayor intensidad durante la noche y al amanecer, lo que corrobora los datos de McGregor (1976). Aunque se apreciaron diferencias entre variedades en el cuajado, el desarrollo de las flores fue idéntico en todas las variedades. En todas, las anteras estuvieron dehiscidas en el estado de ‘quilla saliendo’, antes de la antesis, contrariamente a los resultados de Galloni *et al.* (2007) que indican que las anteras dehiscen en estado de ‘flor abierta’. En el estado de ‘quilla saliendo’, el estilo emergió por encima de las anteras, lo que puede representar una estrategia para minimizar la frecuencia de autopolinización, como ya se sugirió tempranamente en la esparceta (Knuth 1906, citado por McGregor 1976), en *Lupinus nanus* (Juncosa y Webster 1989) y en *Trigonella balansae* (Nair *et al.* 2004).

La rapidez de evolución de las flores y la dehiscencia precoz obligó al muestreo de flores con el estigma en botón colorado para su posterior manejo en el laboratorio, estado en el cual las flores, diminutas, no tuvieron las reservas necesarias para sostener su desarrollo. Ello hizo que el estigma de las flores conservadas en el laboratorio no llegase nunca a ser receptivo. En cambio, las muestras frescas observadas directamente al microscopio, presentaron una fuerte fluorescencia natural que, asociada a la evolución particularmente gráfica del estigma, permitió agilizar las observaciones y evitar la utilización del laboratorio. Gracias a ello, se ha caracterizado la fase que va desde la polinización a la fecundación en la esparceta, en condiciones idóneas, se ha secuenciado el proceso reproductivo, estableciendo los tiempos necesarios para la fase progámica, y determinado los periodos de receptividad estigmática, germinación, crecimiento y llegada de los tubos polínicos al ovario.

El momento en que el estigma adquiere la receptividad, la apertura de las papilas estigmáticas, se asocia a la secreción de compuestos que permiten la germinación del grano de polen. Uno de estos compuestos son lípidos similares a los que contienen las solanáceas (Wolters-Arts *et al.* 1998) y la leguminosa *Sesamum indicum* (Berlingeri y Jauregui 2002), siendo el carácter hidrofóbico de las secreciones un factor de importancia para la germinación de los granos (Lush *et al.* 2000). Berlingeri y Jauregui (2002) señalaron que las secreciones del estigma del sésamo está compuesta de lípidos, polisacáridos y pectinas, implicados en la adherencia de los granos de polen y su germinación, mientras que el tejido de transmisión del estilo produce una secreción rica en carbohidratos que sostiene el crecimiento del tubo polínico. Los resultados obtenidos muestran que la receptividad estigmática en la esparceta, periodo en el cual el estigma receptivo y el pistilo maduro están en el momento propicio para acoger y promover el crecimiento del grano de polen, se puede establecer de las 9h a las 17h. No obstante, la calidad del polen también va evolucionando en el tiempo.

El camino del tubo polínico, en la fase que va desde polinización a fecundación, siguió patrones similares a otras especies. El polen llega a la superficie del estigma donde las células especializadas del estigma sirven de sustrato para los granos de polen, permiten la rehidratación y germinación de los granos de polen y comienza el crecimiento del tubo polínico a través del estilo, que provee al tubo polínico de nutrientes (Herrero 1992). En la esparceta, la llegada al ovario se realizó en 24h, un periodo corto si se compara con una semana en el caso del cerezo o tres semanas en el melocotonero (Hedhly *et al.* 2009; Herrero y Arbeloa 1989), pero similar a lo que ocurre en *Medicago spp* donde el tubo polínico alcanza el óvulo entre 24 y 32h según las especies (Sangduen *et al.* 1983). A partir de este instante se inició la fructificación.

## IV.2 Viabilidad polínica

El estudio de la calidad del polen exigió la puesta a punto de un protocolo de evaluación. El método de diacetato de fluoresceína resultó fiable y consistente y permitió la determinación de la viabilidad del polen a distintas horas del día y en distintos estados fenológicos de la flor. El polen de esparceta es de forma ovalada, dividido en tres secciones y recubierto de una ornamentación reticulada (Pavlova y Manova 2000).

El polen recién dehiscido presentó la mayor viabilidad en el estado de ‘quilla saliendo’. El polen se vio afectado por las temperaturas altas antes de la dehiscencia, que disminuyeron la viabilidad, así como por el estrés hídrico. El polen, al ser producido por la planta en poco tiempo, refleja el nivel de estrés de la planta. Así, el polen de *Trifolium fragiferum* se vio afectado por las bajas temperaturas (Jakobsen y Martens 1994) y el estrés hídrico (Bissuel-Belaygue *et al.* 2002). En nuestro caso, el nivel de estrés hídrico que sufrieron las plantas, estuvo correlacionado con temperaturas altas y, como consecuencia, el polen con mayor viabilidad fue el polen recogido al amanecer. La sensibilidad del polen a temperaturas altas refleja la sensibilidad de la planta, como se manifestó en el Ensayo I, donde la mortalidad de las plantas estuvo altamente correlacionada con temperaturas altas.

En el caso de polinización abierta, la merma de calidad del polen se produce al mismo tiempo que la disminución de polinizadores en actividad y puede conllevar una disminución de la eficacia reproductora de las plantas (Jakobsen y Martens 1994).

### IV.3 Auto(in)compatibilidad

El nivel de autocompatibilidad de la esparceta se evaluó, en condiciones de aislamiento de vectores externos de polen y con polinizaciones controladas, mediante la observación del comportamiento de los tubos polínicos y del nivel de cuajado.

Según Galloni *et al.* (2007), en el caso de flores hermafroditas la importancia de cada uno de los sexos constituye un indicador del sistema de cruzamiento; las flores autógamias tienen asegurado el éxito reproductor y, como consecuencia, tienden a disminuir la cantidad de polen producido y viceversa. La esparceta con su único óvulo y un polen abundante, es una leguminosa con una asignación macho/hembra muy elevada, lo que sugiere que podría tratarse de una planta alógama.

En las condiciones del ensayo, las inflorescencias embolsadas tuvieron un nivel de cuajado entre el 0,0 % y el 2,7 %, según variedades, con una media de 1,1 %. En caso de la polinización controlada las flores autopolinizadas presentaron tubos polínicos en la base en el 48,3 % vs el 63,3 % en las flores polinizadas mediante cruzamientos. Sin embargo el cuajado en el caso de polinización controlada fue del 15,5 % en autopolinización vs 11,3 % en polinización cruzada. Esta aparente discrepancia entre el ensayo de embolsado y el de autopolinización manual sugiere que el material testado de esparceta es autocompatible, pero con una alta necesidad de polinización por insectos.

La falta de autopolinización se explica por la morfología de la flor de esparceta en la cual el crecimiento paulatino del estilo tras el desarrollo de la misma da lugar a que cuando las anteras dehiscen, el estigma supere en un 1mm el nivel de las anteras, dificultando la llegada del polen. La necesidad de un choque físico, o *tripping* que rompa la cutícula del estigma, como el encontrado en *Trigonella balansae* (Nair *et al.* 2004) o en *Hedysarum glomeratum* donde mejoró el nivel de cuajado de 0,0 % a 11,0 % (De las Heras *et al.* 2001), permitió también mejorar el cuajado en la esparceta de 1,0 % a 5,1 % (Thomson 1938).

El nivel de cuajado en el caso de polinización abierta fue del 27,8 % vs 15,5 % y 11,3 % en el caso de polinización controlada en auto y polinización cruzada respectivamente, a pesar de que la polinización se realizó en el momento óptimo y con polen con buena viabilidad. Otros autores (Nair *et al.* 2004) con resultados similares, lo atribuyen a la menor eficacia del experimentador frente al insecto. De hecho, las flores de la esparceta producen mucho polen y abundante néctar rico en azúcares (0,2 ml a 0,4 ml por flor), particularmente apreciado por los insectos (Mcgregor 1976).

Las abejas y los megaquílicos constituyen los principales polinizadores de las flores, que las visitan varias veces, a algunas más de diez, siendo el número óptimo de visitas de cuatro o más (Bogoyavlenskii 1974 citado por Richards y Edwards 1988), lo que explica la mayor eficacia polinizadora de los insectos. Ello se ve apoyado por el hecho de que a lo largo de la corta vida de la flor, los estigmas van madurando de un modo asincrónico.

La alta variabilidad entre flores y entre plantas distintas no puede atribuirse a la arquitectura de la inflorescencia y a la limitación trófica en su seno, como ocurre en *Corydalis* o *Panracium* (Medrano *et al.* 2000; Zeng *et al.* 2009), o a la “especialización” de las flores en la inflorescencia, diferenciándose las flores basales con mejor provisión energética de las flores apicales donantes de polen, ya que las flores fueron elegidas siempre en la parte media de las inflorescencias.

La ausencia de diferencias significativas entre autopolinización y polinización cruzada, tanto en el número de flores con tubos polínicos como en el cuajado, sugiere la no existencia de un mecanismo fisiológico de autoincompatibilidad, al igual que ocurre en *Lupinus nanus* donde la limitación de la autopolinización se realiza mediante el impedimento temporal del contacto estigma/polen por protandria y espacial por corona de pelos estigmáticos (Juncosa y Webster 1989). En el caso de autocruzamientos, se han podido observar en otras especies, como el cerezo un número bajo de granos de polen germinando, así como detenimiento del tubo polínico en la mitad del estilo (Wünsch y Hormaza, 2004) o un comportamiento errático de los tubos polínicos llegando al ovario sin encontrar la entrada del micropililo en *Medicago* (Sangduen *et al.* 1983). Sin embargo, ninguna de estas alteraciones se observó en la esparceta.

Dos mecanismos principales se oponen para favorecer o impedir la autopolinización. El inconveniente principal es obviamente la consanguinidad y sus efectos deletéreos. Por otra parte, la autopolinización permite asegurar la producción de semillas y reducir el coste energético de la misma. De ahí proviene la distinción, dentro de las leguminosas, entre anuales, mayoritariamente autocompatibles, y perennes, autoincompatibles (Davies y Young 1966; Nair *et al.* 2004). Sin embargo, varias especies presentan autocompatibilidad facultativa o adaptaciones a condiciones ambientales como es el caso de *Trifolium fragiferum*, especie autoincompatible en la cuenca mediterránea y autocompatible en el norte de Europa.

Stebbins (1950) citado por Davies y Young (1966) y Nair *et al.* (2004) mencionan que la depresión de consanguinidad no es un hecho sistemático y menos en las primeras generaciones; cuando sobreviene en una parte de la población, puede tratarse de un mecanismo evolutivo en marcha. De hecho, la depresión por consanguinidad es el principal obstáculo para la transición de un sistema de autoincompatibilidad a un sistema de autocompatibilidad; se podría resolver con el aumento progresivo de las plantas autocompatibles en el seno de una población, eliminando progresivamente los genes deletéreos (Stebbins 1950, citado por Davies y Young 1966). En el caso de la esparceta, las plantas resultantes de la autopolinización presentaron un 30% de tallos menos que las plantas proviniendo de polinización cruzada (Bosca y Hejja 1963, citado por Mcgregor 1976), lo que sugiere la posibilidad de cierta depresión de consanguinidad en la esparceta.

## **V. CONCLUSIONES**

Los estudios llevados a cabo permitieron caracterizar el desarrollo de la floración, tanto a nivel de la inflorescencia como de la flor, y la cinética de la fase progámica:

Se obtuvo, por una parte, un mejor conocimiento de los momentos claves en la reproducción de la esparceta, constatando lo efímero que puede ser el periodo óptimo de receptividad estigmática durante el periodo de apertura de la flor, lo que la hace sensible tanto a perturbaciones climáticas, como a las temperaturas altas en el caso del gametofito masculino.

Por otra parte, el control de las fases de desarrollo de la flor y de los tiempos necesarios para cada fase, así como la posibilidad de verificar la viabilidad del polen permitió la realización de fecundaciones con polen propio o cruzado.

Los resultados de los cruzamientos sugieren que no existe un mecanismo fisiológico de autoincompatibilidad, sino que la falta de autogamia observada se debe al espaciamiento físico entre el estigma y las anteras y, quizás, a la necesidad de romper la cutícula estigmática. El nivel de cuajado conseguido en el caso de polinización controlada abre la posibilidad de realizar cruzamientos.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berlinger C, Jauregui D (2002). Comentarios sobre la naturaleza química del exudado estigmático y estilar del ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Ernstia* 12: 87-90.
- Bissuel-Belaygue C, Cowan AA, Marshall AH, Wery J (2002). Reproductive development of white clover (*Trifolium repens* L.) is not impaired by a moderate water deficit that reduces vegetative growth II. Fertilization efficiency and seed set. *Crop Science* 42: 414-422.
- Bosca I, Hejja S (1963). Data on fertilisation in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Novenytermeles* 12: 137-142.
- Davies WE, Young NR (1966). Self-fertility in *Trifolium fragiferum*. *Heredity* 21: 615-624.
- De Jaime Lorén C (2008). Interés ambiental del cultivo de pipirigallo (*Onobrychis viciifolia*): una investigación en el aula. Ed: IES Valle del Jiloca, Teruel, España, 78 pp.
- De las Heras MA, Hidalgo P, Ubera J (2001). Stigmatic cuticle in *Hedysarum glomeratum*: structure and function. *International Journal of Development Biology* 45: 41-42.
- Delgado I, Muñoz F, Demdoun S (2010). Caracterización y valor nutritivo de diferentes estados fenológicos de la esparceta. En: IV Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes, Zamora - Miranda do Douro. 247-252.
- Galloni M, Podda L, Vivarelli D, Cristofolini G (2007). Pollen presentation, pollen-ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterranean legumes (fam. Fabaceae – subfam. Faboideae). *Plant Systematics and Evolution* 266.
- Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M (2009). Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science* 14: 30-36.
- Herrero M, Arbeloa A (1989). Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany* 76: 1441-1447.
- Herrero M (1992). From pollination to fertilization in fruit-trees. *Plant Growth Regulation* 11: 27-32.
- Heslop-Harrison Y (1977). The pollen-stigma interaction: Pollen tube penetration in crocus. *Annals of Botany* 41: 913-922.
- Jakobsen HB, Martens H (1994). Influence of temperature and aging of ovules and pollen on reproductive success in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74: 493-501.
- Juncosa AM, Webster BD (1989). Pollination in *Lupinus nanus* subsp. *latifolius* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 76: 59-66.
- Knuth P (1906). Handbook of flower pollination. Ed: Clarendon, Oxford, UK. 382 pp.
- Linskens HF, Esser K (1957). Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwissenschaften* 44: 16.
- Lush WM, Spurck T, Joosten R (2000). Pollen tube guidance by pistil of a solanaceous plant. *Annals of Botany* 85: 39-47.
- McGregor SE (1976). Insect pollination of cultivated crop-plants. Ed: U.S.D.A
- Medrano M, Guitian P, Guitian J (2000). Patterns of fruit and seed set within inflorescences of *Pancratium maritimum* (Amaryllidaceae): nonuniform pollination, resource limitation, or architectural effects? *American Journal of Botany* 87: 493-501.
- Nair RM, Dundas IS, Wallwork M, Verlin DC, Waterhouse L, Dowling K (2004). Breeding system in a population of *Trigonella balansae* (Leguminosae). *Annals of Botany* 94: 883-888.



- 
- Pavlova DK, Manova VI (2000). Pollen morphology of the genera *Onobrychis* and *Hedysarum* (Hedysareae, Fabaceae) in Bulgaria. *Annales Botanici Fennici* 37: 207-217.
- Richards KW, Edwards PD (1988). Density, diversity, and efficiency of pollinators of sainfoin, *Onobrychis viciaefolia* Scop. *Canadian Entomologist* 120: 1085-1100.
- Sangduen N, Sorensen EL, Liang GH (1983). Pollen germination and pollen tube growth following selfpollination and intra- and interspecific pollination of *Medicago* species. *Euphytica* 32: 527-534.
- SAS (2004). Ed: SAS OnlineDoc® 9.1.3, NC, USA.
- Thomson JR (1938). Cross and self-fertility in sainfoin. *Annals of Applied Biology* 25: 695-704.
- Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392: 818-821.
- Wünsch A, Hormaza JI (2002). Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L) genotypes using peach (*Prunus persica* (L) Batsch) SSR sequences. *Heredity* 89: 56-63.
- Zeng YF, Bai WN, Zhou Y (2009). Variation in floral sex allocation and reproductive success in sequentially flowering inflorescence of *Corydalis remota* var. *lineariloba* (Fumariaceae). *Journal of Integrative Plant Biology & Philosophy* 51: 299-307.



## V. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos permiten formular las siguientes conclusiones generales:

1. En las condiciones del estudio, las 23 variedades expresaron diferencias importantes a nivel agromorfológico, siendo escasas las diferencias observadas a nivel de composición química. La división clásica entre variedades de uno y dos cortes fue insuficiente para describir las variedades, presentando muchas de ellas caracteres intermedios. La intensidad de floración fue el principal parámetro para la caracterización de las mismas, seguido por el porte, la mortalidad y la producción. Las variedades presentaron niveles de composición química que correspondían a un forraje de calidad, con poca variabilidad, siendo la fecha de corte el principal factor de variación. Un grupo de ocho variedades, 'Fakir', 'Visnosky', 'Reznos', 'Selección 7.1', 'Villahoz', 'Yubileyna', 'Polonia' y 'Korunga', destacó por sus buenos valores agromorfológicos. La precocidad fue el principal criterio por el cual las variedades locales divergieron de las foráneas, siendo siete días más precoces en el momento del primer corte. La mortalidad, con una tasa del 50 % al 78 % al cabo de tres años, tuvo lugar principalmente en verano, indicando una limitación metabólica de la esparceta a las temperaturas altas.

2. La agrupación de las variedades, obtenida mediante microsatélites fue más discriminante para determinar el origen geográfico que la realizada con criterios agromorfológicos, sugiriendo que la esparceta se expandió por toda Europa en un estado precoz de selección y fue mejorada posteriormente en diversas localizaciones geográficas. Eso conlleva que existe una base genética amplia para el establecimiento de programas de mejora genética. La obtención de marcadores genéticos válidos en la esparceta, permite su aprovechamiento para la creación de variedades con alto nivel de heterosis.

3. La aplicación de diversos ritmos de corte, dando lugar hasta seis cortes al año, no permitió homogeneizar la distribución del forraje; en todos los tratamientos, la producción media del primer corte fue del 39 % del total anual. En las condiciones del ensayo no hubo diferencias en producción de forraje entre tratamientos. El ritmo de corte afectó, sin embargo, tanto a la calidad del forraje como al estado de las reservas de azúcares, almidón y proteínas de la corona y raíces; la calidad del forraje mejoró con los cortes intensivos, pero aquellos mermaron el nivel de reservas al final del año. 'Cotswold Common' y 'Reznos' se comportaron como tipos de uno y dos cortes, respectivamente, presentando 'Cotswold Common' mayor calidad del forraje y 'Reznos', mayores niveles de reservas.

4. El estudio de la fase progámica mostró lo efímero que es la fase de receptividad estigmática, que la hace vulnerable a perturbaciones climáticas. La fase reproductora es la más delicada, ya que existen mecanismos, físicos y temporales, más que fisiológicos, como pueden ser la separación espacial de las anteras y del pistilo o la existencia de la cutícula estigmática, que impiden la autopolinización.

