



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
**CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA**



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TESIS DOCTORAL

**“Estudios agronómicos y de mejora genética en *Hedysarum coronarium* L.:  
alternativa en agrosistemas de secano mediterráneos”**

Eva María Córdoba Jiménez

Directores:

Dr. Salvador Nadal Moyano  
Dr. José Ignacio Cubero Salmerón

Córdoba, Septiembre 2011

TITULO: *Estudios agronómicos y de mejora genética en Hedysarum coronarium L.: alternativa en agrosistemas de secano mediterráneos*

AUTOR: *Eva María Córdoba Jiménez*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-695-1270-8



El doctorando agradece al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de la beca predoctoral para la realización de esta Tesis Doctoral.



**A mis padres**



## AGRADECIMIENTOS

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una Tesis Doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. Intentaré desde estas líneas expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado y ayudado en mi trayectoria profesional, y más concretamente, en la culminación de la presente Tesis Doctoral, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad. En particular, mis agradecimientos van dirigidos a las siguientes personas:

En primer lugar a mis directores Dr. José Ignacio Cubero Salmerón y Dr. Salvador Nadal por haber creído en mí y haberme apoyado de manera totalmente incondicional desde el principio, y como no, por sus horas de dedicación, su esfuerzo y cariño. Su capacidad de trabajo y organización me han servido como referente durante todos estos años que llevo trabajando a su lado.

A la Dr. Belén Román, porque siempre me ha ofreciendo su respaldo y ánimo. Sin su ayuda y enseñanzas no hubiera sido posible alcanzar determinados objetivos.

A la Dr. Clara González-Verdejo, por su apoyo y buenos consejos. Muchas gracias por estar siempre ahí.

Al Dr. José Vicente Die, que me ha transmitido su motivación por la investigación y siempre ha estado cercano y localizable en cualquier momento y lugar para orientarme y “sacarme” de mis angustias, inquietudes y dudas.

Gracias a Lola Madrid, Gema González y Ángela Obrero por su sincera amistad y por contar siempre con su apoyo y aliento para lo que necesitara.

A Cristóbal Martínez que siempre ha estado a mi lado y al cual le debo el éxito de muchos de mis ensayos. Gracias por ser un compañero y amigo.

A Antonio y Miguel por la ayuda prestada en los trabajos de campo.

Y a Mercedes, Amparo, Ana Pozo, Gloria, Ana Torres, Jose Rubio, Natalia, Carmen Ávila, Juan Prieto, María Dolores, Sara, Josefina y alguno que haya podido olvidar por hacerme sentir tan querida.

Por último a mi familia y a mi marido por todos los motivos imaginables.

Gracias a todos

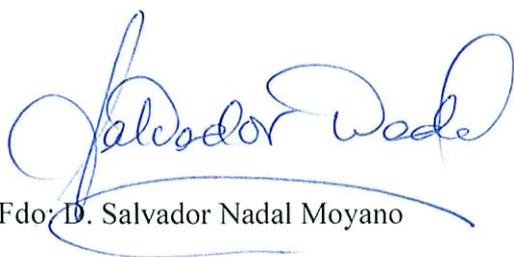


D. Salvador Nadal Moyano, Investigador del Área de Producción Agraria del IFAPA, Centro Alameda del Obispo.

D. José Ignacio Cubero Salmerón, Profesor Emérito del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

## INFORMAN

Que el trabajo titulado: “**Estudios agronómicos y de mejora genética en *Hedysarum coronarium* L.: alternativa en agrosistemas de secano mediterráneos**”, realizado por Dña. Eva María Córdoba Jiménez, bajo nuestra dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.



Fdo: D. Salvador Nadal Moyano



Fdo. José Ignacio Cubero Salmerón

Córdoba, Septiembre de 2011



## DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

### Artículos publicados en revistas con índice de impacto

- E.M. Córdoba, J.V. Die, C.I. González-Verdejo, S. Nadal, B. Román. Selection of reference genes in *Hedysarum coronarium* under various stresses and stages of development. *Analytical Biochemistry* 2011; 409(2): 236-243. Índice de impacto (año 2010): 3,236
- E. Córdoba, C. I. González-Verdejo, J. Die, B. Román, and S. Nadal. First Report of *Orobanche crenata* on Sulla (*Hedysarum coronarium*) in Andalusia, Southern Spain. *Plant Disease*, 92(12): 1709. Índice de impacto (año 2008): 1,87



# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
INTRODUCCIÓN	1
1. Introducción general	3
1.1. Seguridad alimentaria-crisis alimentaria	3
1.2. Nuevos desafíos-nuevas agriculturas	6
2. <i>Hedysarum coronarium</i> L.	6
2.1. Origen y referencias históricas de la especie	6
2.2. Taxonomía y morfología	7
3. Agronomía de la especie	10
3.1. Aspectos generales	10
3.2. Exigencias edafoclimáticas y ecológicas	12
3.2.1. <i>Rhizobium</i> específico de la especie	12
3.3. Formas de aprovechamientos	14
3.4. Labores culturales	17
3.4.1. Fecha de siembra y dosis adecuada	17
3.4.2. Fertilización del cultivo	18
3.4.3. Problemas de estreses bióticos	19
4. Calidad nutritiva	21
5. Mejora genética	28
6. Referencias	32
OBJETIVOS	41

## CAPITULO I

<b>RECURSOS FITOGENÉTICOS DE <i>HEDYSARUM CORONARIUM L.</i></b>	<b>45</b>
1. Introducción	47
2. Materiales y métodos	48
2.1. Prospección y recolección	48
2.2. Caracterización	49
2.3. Análisis y estudio de la variabilidad	51
2.3.1. Estadística descriptiva	52
2.3.2. Análisis de la varianza	52
2.3.3. Correlación lineal	52
2.3.4. Análisis de componentes principales	53
3. Resultados	55
3.1. Prospección y recolección	55
3.2. Caracterización del material	56
3.3. Relaciones entre los caracteres estudiados	58
3.4. Factores determinantes de la variabilidad	61
4. Discusión	63
5. Referencias	68

## CAPÍTULO II

<b>ADAPTACIÓN Y RESPUESTA AGRONÓMICA DE <i>HEDYSARUM CORONARIUM L.</i> EN DIFERENTES AGROSISTEMAS DE SECANO MEDITERRÁNEOS</b>	<b>70</b>
1. Introducción	73
2. Materiales y métodos	74
2.1. Características edafoclimáticas de los ambientes experimentales	74
2.2. Material vegetal y evaluación agronómica de los dos ensayos realizados	76
2.3. Análisis estadísticos	79
3. Resultados	80
3.1. Identificación de ecotipos de mayor respuesta en rendimiento de forraje y calidad en las condiciones ensayadas para el manejo tradicional	80

3.2. Evaluación del comportamiento productivo del cultivo de <i>Hedysarum coronarium</i> L. sometido a diferentes regímenes de aprovechamiento (fecha de siega) en dos ambientes contrastantes	85
4. Discusión	94
5. Referencias	99

### CAPÍTULO III

<b>ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE <i>HEDYSARUM CORONARIUM</i> L. A <i>OROBANCHE CRENATA</i> FORSK.</b>	<b>101</b>
1. Introducción	103
2. Materiales y métodos	103
2.1. Material vegetal	103
2.2. Prueba de viabilidad de las semillas de jopo	104
2.3. Desinfección de las semillas de <i>H. coronarium</i> y <i>O. crenata</i>	104
2.4. Acondicionamiento de las semillas de jopo	104
2.5. Metodología	105
3. Resultados	106
4. Discusión	110
5. Referencias	112

### CAPÍTULO IV

<b>CONTENIDO DE TANINOS CONDENSADOS EN <i>HEDYSARUM CORONARIUM</i> L.</b>	<b>115</b>
1. Introducción	117
2. Materiales y métodos	118
2.1. Material vegetal	118
2.2. Preparación de las muestras	119
2.3. Determinación de taninos condensados	120
3. Resultados	121
4. Discusión	127
5. Referencias	129

## CAPÍTULO V

### BASES MOLECULARES PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN *HEDYSARUM CORONARIUM* L.

	133
1. Introducción	135
2. Materiales y métodos	137
2.1. Optimización de un protocolo de aislamiento de ARN de hojas de <i>Hedysarum coronarium</i> L. que proporcionara la cantidad y calidad requerida para estudios de expresión génica.	137
2.1.1. Material vegetal	137
2.1.2. Metodología	138
2.2. Selección de genes de referencia en <i>Hedysarum coronarium</i> L. bajo distintos estreses y etapas de desarrollo	139
2.2.1. Material vegetal	139
2.2.2. Extracción de ARN total y síntesis de cDNA	140
2.2.3. PCR cuantitativa en tiempo-real y análisis de datos	141
3. Resultados	144
3.1. Resultados del protocolo optimizado para el aislamiento de ARN de hojas de <i>H. coronarium</i>	144
3.2. Resultados de la selección de genes de referencia en <i>Hedysarum coronarium</i> L.	146
3.2.1. Calidad del ARN	146
3.2.2. Especificidad y eficiencia de los cebadores en las reacciones de qPCR	146
3.2.3. Niveles de expresión de los genes de referencia candidatos	147
3.2.4. Estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos	148
3.2.4.1. Análisis con geNORM	148
3.2.4.2. Análisis con BestKeeper	150
3.2.4.3. Análisis con qBase	151
4. Discusión	152
5. Referencias	155

<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>MEJORA GENÉTICA DE <i>HEDYSARUM CORONARIUM</i> L.</b>	<b>159</b>
1. Introducción	161
2. Materiales y métodos	162
2.1. Criterios de Mejora	162
2.2. Material vegetal	163
2.3. Metodología	163
2.3.1. Selección de líneas de semilla blanda	163
2.3.2. Método de mejora	163
2.4. Análisis estadísticos	168
3. Resultados	168
3.1. Selección de poblaciones de mayor proporción de semilla blanda y de germinación de semilla vestida	168
3.2. Resultados del proceso de desarrollo de la nueva población	169
4. Discusión	171
5. Referencias	173
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>179</b>
Anexo I	181
Anexo II	182
Anexo III	183
Anexo IV	185



## ÍNDICE DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1:</b> Uso del maíz para la producción de etanol en US (en millones de toneladas)	5
<b>Tabla 2:</b> Análisis provincial de la superficie de <i>Hedysarum coronarium</i> L., 2008 (MARM)	11

### **CAPÍTULO I: Recursos Fitogenéticos de *Hedysarum coronarium* L.**

<b>Tabla 1:</b> Poblaciones de zulla ( <i>Hedysarum coronarium</i> L.) recolectadas durante los años 2004-2008	50
<b>Tabla 2:</b> Coordenadas y datos de pasaporte de las nuevas poblaciones de zulla colectadas en el 2009/10	55
<b>Tabla 3:</b> Valores medios $\pm$ es y coeficiente de variación para inicio, fin de floración (días), altura (cm), longitud del tallo principal (cm), número de entrenudos, área foliar (cm <sup>2</sup> ), número de folíolos, grosor del tallo principal (cm) e inflorescencias de las entradas de la colección de trabajo de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	57
<b>Tabla 4:</b> Análisis de correlaciones de los caracteres estudiados.	59
<b>Tabla 5:</b> Frecuencia del tipo de porte (%) que presentan las distintas poblaciones de zulla	60
<b>Tabla 6:</b> Autovalores, porcentaje del componente y porcentaje acumulado en el análisis de componentes principales de los caracteres cuantitativos	61
<b>Tabla 7:</b> Vectores propios de la matriz de correlación basados en los caracteres morfológicos de <i>H. coronarium</i>	62

### **CAPÍTULO II: Adaptación y respuesta agronómica de *Hedysarum coronarium* L. en diferentes agrosistemas de secano mediterráneos**

<b>Tabla 1:</b> Media anual de producción de <i>Hedysarum coronarium</i> , durante su primer ciclo de cultivo	81
<b>Tabla 2:</b> Número de plantas nacidas de semilla y plantas del año anterior rebrotadas de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	82
<b>Tabla 3:</b> Correlaciones entre los diferentes parámetros evaluados.	83
<b>Tabla 4:</b> Media anual de producción de <i>Hedysarum coronarium</i> , durante su segundo ciclo de cultivo.	84
<b>Tabla 5:</b> Correlaciones entre los diferentes parámetros evaluados en el segundo ciclo del cultivo.	85
<b>Tablas 6:</b> Resultados del análisis de la varianza conjunto de la producción de forraje verde	85
<b>Tabla 7:</b> Resultados del análisis de la varianza conjunto para el rendimiento de la materia seca (RMS).	86
<b>Tablas 8:</b> Resultados del análisis de la varianza para la producción de forraje verde considerando la localidad de Jerez.	89
<b>Tabla 9:</b> Resultados del análisis de la varianza para el rendimiento de la materia seca (RMS) considerando la localidad de Jerez	90

<b>Tablas 10:</b> Resultados del análisis de la varianza para la producción de forraje verde considerando la localidad de Palermo.	<b>90</b>
<b>Tabla 11:</b> Resultados de análisis de la varianza para el rendimiento de la materia seca (RMS) considerando la localidad de Palermo.	<b>91</b>

### **CAPÍTULO III: Estudios preliminares de la susceptibilidad de *Hedysarum coronarium* L. a *Orobancha crenata* Forsk**

<b>Tabla 1:</b> Descomposición de los mecanismos de resistencia a <i>Orobancha crenata</i> en diferentes entradas de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	<b>108</b>
<b>Tabla 2:</b> Descomposición de los mecanismos de resistencia a <i>Orobancha crenata</i> en diferentes ecotipos de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	<b>109</b>
<b>Tabla 3:</b> Germinación de semillas de <i>Orobancha crenata</i> en presencia de agua (1), de la raíz de la planta hospedadora (2) y de la raíz de la planta hospedadora con GR24 como control (3).	<b>110</b>

### **CAPÍTULO IV: Contenido de taninos condensados *Hedysarum coronarium* L.**

<b>Tabla 1:</b> Contenido de taninos condensados (TC) en toda la planta de zulla (o en tallos y hojas cuando se citan).	<b>118</b>
<b>Tabla 2:</b> Concentración de taninos condensados (% de la MS) en tejidos de hojas de diferentes genotipos de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	<b>123</b>
<b>Tabla 3:</b> Resultados del análisis de la varianza para la concentración de taninos condensados según el origen de los genotipos de <i>H. coronarium</i>	<b>124</b>
<b>Tabla 4:</b> Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población 12 de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	<b>125</b>
<b>Tabla 5:</b> Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población 31 de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	<b>125</b>
<b>Tabla 6:</b> Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población Torresalsa de <i>Hedysarum coronarium</i> L	<b>126</b>
<b>Tabla 7:</b> Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población Centuripe de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	<b>126</b>

### **CAPÍTULO V: Bases moleculares para estudios de expresión génica en *Hedysarum coronarium* L.**

<b>Tabla 1:</b> Secuencias de los cebadores degenerados, temperatura de fusión (T <sub>m</sub> ) y longitud del amplicón.	<b>142</b>
<b>Tabla 2:</b> Cebadores diseñados para qPCR. Longitud y temperatura de fusión (T <sub>m</sub> ) del amplicón y eficiencia de amplificación (%).	<b>142</b>
<b>Tabla 3:</b> Análisis estadístico según BestKeeper	<b>151</b>

### **CAPÍTULO VI: Mejora genética de *Hedysarum coronarium* L**

<b>Tabla 1:</b> Valores medios de germinación de semillas descascarilladas y sin descascarillar de diferentes poblaciones/variedades de <i>Hedysarum coronarium</i> L	<b>169</b>
---	------------

**Tabla 2:** Producción de semilla (g) de las poblaciones 26 y 3 en la campaña 2007/08.

**170**

**Tabla 3:** Valores medios de germinación de semillas descascarilladas de la línea Córdoba.

**170**



## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1:</b> Evolución del consumo de carne en China del 1980 al 2007 (FAOSTAT).	4
<b>Figura 2:</b> Índice de la FAO para los precios de los alimentos.	4
<b>Figura 3:</b> Previsión del aumento de la población mundial.	5
<b>Figura 4:</b> Inflorescencias compactas de grandes flores púrpura y mutantes de flores blancas de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	8
<b>Figura 5:</b> Infrutescencia de <i>Hedysarum coronarium</i> L.	9
<b>Figura 6:</b> A, semillas de color crema típicas de zulla y con un alto porcentaje de dureza; B, semillas de color marrón con alto porcentaje de germinación	10
<b>Figura 7:</b> Evolución de la superficie cultivada (miles de hectáreas) de <i>Hedysarum coronarium</i> L. durante un periodo de 18 años.	11
<b>Figura 8:</b> Principales formas de aprovechamiento de <i>H. coronarium</i> .	14
<b>Figura 9:</b> <i>Hedysarum coronarium</i> L. afectada por la planta parásita <i>Orobancha crenata</i> F. (jopo).	19
<b>Figura 10:</b> Conteo de número de huevos de parásitos contados por gramo de heces (hpg) en corderos parasitados no tratados farmacológicamente pastoreando alfalfa o zulla (Nieven et al., 1995). Donde hpg es el número de huevos de parásitos contados por gramo de heces en corderos.	28

### CAPÍTULO I: Recursos Fitogenéticos de *Hedysarum coronarium* L.

<b>Figura 1:</b> Distribución de <i>Hedysarum coronarium</i> en la provincia de Cádiz (Gutiérrez-Más, 1982).	48
<b>Figura 2:</b> Mapa de distribución de las 14 nuevas poblaciones de <i>Hedysarum coronarium</i> L. colectadas durante los años 2009-2010.	56
<b>Figura 3:</b> Distribución gráfica de los genotipos de <i>H. coronarium</i> según el análisis de componentes principales basado en las variables cuantitativas analizadas. Las líneas que se cruzan en el (0,0) representan las variables originales (FF, fin de floración; I, número de inflorescencias; LTP, longitud del tallo principal; E, número de entrenudos; F, número de foliolos; IF, inicio de floración; GTP, grosor del tallo principal; A, altura y AF, área foliar). La longitud de cada vector es proporcional a su contribución en las CPs. Los puntos se corresponden con las entradas estudiadas.	63
<b>Figura 4:</b> Distribución de los genotipos de <i>H. coronarium</i> según el análisis de componentes principales basado en las variables cuantitativas analizadas. Las líneas que se cruzan en el (0,0) representan las variables originales (FF, fin de floración; I, número de inflorescencias; LTP, longitud del tallo principal; E, número de entrenudos; F, número de foliolos; IF, inicio de floración; GTP, grosor del tallo principal; A, altura y AF, área foliar). Grupo I: entradas <i>Hc-1</i> , <i>Hc-25</i> , <i>Hc-34</i> , Carmen cv., Grimaldi cv. y Del País cv. Grupo II: <i>Hc-5</i> , <i>Hc-6</i> , <i>Hc-7</i> , <i>Hc-8</i> , <i>Hc-13</i> , <i>Hc-14</i> , <i>Hc-15</i> , <i>Hc-16</i> , <i>Hc-17</i> , <i>Hc-23</i> , <i>Hc-24</i> , <i>Hc-29</i> , <i>Hc-30</i> y <i>Hc-31</i> y Grupo III: <i>Hc-3</i> , <i>Hc-4</i> , <i>Hc-9</i> , <i>Hc-10</i> , <i>Hc-12</i> , <i>Hc-18</i> , <i>Hc-27</i> y <i>Hc-32</i> .	67

## **CAPÍTULO II: Adaptación y respuesta agronómica de *Hedysarum coronarium* L. en diferentes agrosistemas de secano mediterráneos.**

<b>Figura 1:</b> Rendimientos medios para España de leguminosas forrajeras (año 2004, último año disponible) (Fuente: MARM)	73
<b>Figura 2:</b> Distribución de las precipitaciones y T <sup>a</sup> media mensual durante los dos años del ensayo 2009/10 y 2010/11 en la finca experimental del IFAPA Centro “Rancho de la Merced”	75
<b>Figura 3:</b> Distribución de las precipitaciones y T <sup>a</sup> media mensual desde septiembre a julio en la campaña agrícola 2009/10 en un área montañosa de Palermo (Sicilia)	75
<b>Figura 4:</b> Diseño de bloques al azar con tres repeticiones utilizado para la evaluación agronómica de diferentes ecotipos de zulla en Jerez.	77
<b>Figura 5:</b> Diseño experimental de parcelas divididas para evaluar el potencial productivo de la zulla, establecido en dos ambientes contrastantes: Jerez (Cádiz) y Palermo (Sicilia).	79
<b>Figura 6:</b> Comportamiento de los genotipos de <i>H. coronarium</i> y valores medios de forraje verde (kg/ha) en los dos ambientes estudiados.	87
<b>Figura 7:</b> Comportamiento de los genotipos de <i>H. coronarium</i> y valores medios del rendimiento de materia seca (RMS) (kg/ha) en los dos ambientes estudiados.	87
<b>Figura 8:</b> Medias de la producción de forraje verde (kg/ha) de Palermo y Jerez en cada tratamiento del cultivo.	88
<b>Figura 9:</b> Medias del RMS (kg/ha) de Palermo y Jerez en cada tratamiento del cultivo.	89
<b>Figura 10:</b> Comportamiento de los genotipos de <i>H. coronarium</i> y valores medios de la producción de forraje verde (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Jerez.	92
<b>Figura 11:</b> Comportamiento de los genotipos de <i>H. coronarium</i> y valores medios del RMS (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Jerez.	92
<b>Figura 12:</b> Comportamiento de los genotipos de <i>H. coronarium</i> y valores medios de la producción de forraje verde (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Palermo.	93
<b>Figura 13:</b> Comportamiento de los genotipos de <i>H. coronarium</i> y valores medios del RMS (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Palermo.	94

## **CAPÍTULO III: Estudios preliminares de la susceptibilidad de *Hedysarum coronarium* L. a *Orobanche crenata* Forsk**

<b>Figura 1:</b> Fases del proceso de infección de <i>Orobanche crenata</i> en <i>Hedysarum coronarium</i> . (A) Semillas germinadas de <i>O. crenata</i> . (B) Semillas germinadas de <i>O. crenata</i> en las primeras fases de infección. (C) Fases iniciales de formación del nódulo. (D) Engrosamiento de tubérculos de <i>O. crenata</i> .	107
--	-----

## **CAPÍTULO IV: Contenido de taninos condensados *Hedysarum coronarium* L.**

<b>Figura 1:</b> Pregerminación de semillas de <i>H. coronarium</i> (A). Genotipos de <i>H. coronarium</i> en condiciones controladas, utilizados en el análisis de taninos condensados (B).	119
--	-----

**Figura 2:** Curva de calibración de delfinidina para la estimación de taninos condensados en *Hedysarum coronarium* L. 121

## **CAPÍTULO V: Bases moleculares para estudios de expresión génica en *Hedysarum coronarium* L.**

**Figura 1:** Verificación de la integridad de ARN totales extraídos de *H. coronarium*. (A) Las muestras de ARN totales obtenidas de las hojas fueron fraccionadas en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2 % y teñidas con bromuro de etidio para su visualización. En la imagen se observan las subunidades ribosomales 18S y 25S correspondientes a cuatro muestras de RNA totales: el carril M es el marcador de peso molecular de 175 pb; los carriles 1 y 2 corresponden al ARN extraído por el protocolo modificado; el carril 3 es el ARN extraído con Trizol y el carril 4 el ARN extraído por el método del borato sódico caliente. (B) Electroferograma obtenido para una muestra de ARN total de hojas de zulla extraído por el método propuesto en este estudio tras su migración en el bioanalizador Experion. 145

**Figura 2:** Verificación de la calidad de los ARNm. A partir de los mARNs aislados de cada muestra se sintetizaron cDNAs de hebra simple, que se utilizaron como molde para la amplificación mediante qPCR. (A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR del ARN total extraído de hojas de zulla. (B) Verificación de los productos específicos de las reacciones de qPCR: Las curvas de disociación del 18S ARNr muestran un solo pico. 146

**Figura 3:** Especificidad de la reacción de qPCR. Curvas de disociación de todos los genes de referencia en las que se observa un solo pico 147

**Figura 4:** Valores medios de la estabilidad de la expresión, M, de los posibles genes de referencia. A) las 24 muestras incluyendo las diferentes etapas de desarrollo y los estreses abióticos; B) varias etapas de desarrollo; C) varios estreses abióticos. Los valores más bajos de M se corresponden con los genes más estables, que son los más adecuados para normalizar. 148

**Figura 5:** Determinación del número óptimo de genes de referencia  $V_n / V_{n+1}$  calculado por geNORM. (A) total de muestras; (B) varias etapas de desarrollo; (C) diferentes tratamientos de estreses. 149

## **CAPÍTULO VI: Mejora genética de *Hedysarum coronarium* L**

**Figura 1:** Plántulas de zulla germinadas en bandejas de alveolos de plástico en el invernadero. 164

**Figura 2:** Marco de plantación utilizado para formar la nueva población de *Hedysarum coronarium*. 164

**Figura 3:** Parcela de zulla establecida en el IFAPA Centro “Rancho de la Merced”. A, zulla en las primeras etapas del estado vegetativo. B, zulla en floración. 165

**Figura 4:** Esquema seguido en el desarrollo de la nueva población de zulla. 167



## SUMMARY

Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) is a short-lived perennial legume native to the Mediterranean basin, where it is extensively grown as a 2-year forage crop for grazing and/or hay or silage production. Today there is a growing interest in sulla in traditional and in non-traditional areas (particularly in New Zealand and Australia), due to its excellent adaptability to marginal and drought-prone environments; versatility as a forage crop (e.g., used for grazing, hay and silage production, and grazing associated with hay production); and good-quality forage with high protein content and moderate levels of condensed tannins. Finding new crops to complement wheat and sunflower in dry Mediterranean crop system is one of the main problems in the new sustainable agriculture. Therefore this paper aims to contribute to a better understanding of sulla from different approaches in order to have a candidate species to include, with rational criteria, as an alternative crop in Andalusian drylands. In particular, to achieve these objectives the following studies have been carried out: characterization of the accessions of our breeding collection, agronomic evaluation in different Mediterranean rainfed conditions, resistance evaluation to the parasitic plant *Orobanche crenata*, determination of the concentration of condensed tannins, determination of the molecular basis for gene expression studies and the development of new plant materials, stable and with higher forage yields. The results showed a large degree of phenotypic variability among Andalusian wild populations, great potential as a forage crop, a large degree of variability of condensed tannin contents and a very promising future for the populations developed so far. Moreover, a great consideration should be taken to the potential risk of *Orobanche crenata* infection in the species according to the resistance results. Considering these achievements we conclude that sulla may be an alternative crop in our dryland and in the future these studies should continue to produce more productive and adapted materials to our environmental conditions.

## RESUMEN

La zulla (*Hedysarum coronarium* L.) es una leguminosa perenne de vida corta, originaria de la Cuenca Mediterránea. Su aprovechamiento principal es como cultivo forrajero de dos años para el pastoreo y/o para la producción de heno o ensilado. Actualmente existe un gran interés en la zulla en áreas tradicionales y no tradicionales de su cultivo (particularmente en Nueva Zelanda y en Australia), debido a su excelente adaptabilidad a ambientes marginales y secos, a su versatilidad como cultivo forrajero (es usada para pastoreo y/o para producción de heno o ensilado y para pastoreo asociado a producción de heno), y por producir un forraje de buena calidad, con alto contenido en proteína y con niveles moderados, los deseables, de taninos condensados. Encontrar nuevos cultivos que complementen al cereal, en rotaciones racionales en los sistemas de secano Mediterráneos es uno de los principales retos en el nuevo contexto de sostenibilidad. En este trabajo se planteó como objetivo contribuir a un mejor conocimiento de la zulla desde diferentes enfoques con objeto de disponer de otra especie a incluir en las alternativas de cultivo en los secanos andaluces. En particular para lograr este objetivo se llevaron a cabo diferentes estudios de agronomía y mejora genética en la especie: la caracterización de las entradas que formaban parte de la colección de germoplasma, la evaluación agronómica en diferentes condiciones de secano mediterráneo, evaluación de la resistencia a la planta parásita *O. crenata*, determinación de la concentración de taninos condensados, determinación de las bases moleculares para estudios de expresión génica y el desarrollo de nuevos materiales vegetales, más estables y con un mayor rendimiento de forraje. Los resultados obtenidos mostraron un alto grado de variabilidad fenotípica entre las poblaciones silvestres de Andalucía, su gran potencial como cultivo forrajero, un alto grado de variabilidad en el contenido de taninos condensados y nuevos materiales vegetales de mejora adaptados a las condiciones específicas andaluzas. Por otra parte se debería de considerar el riesgo potencial de infección de *O. crenata* en la especie según los resultados obtenidos. Por lo expuesto anteriormente, la zulla puede ser un cultivo alternativo para nuestras condiciones de secano, lo que debe de animarnos a seguir estudiándola desde los diferentes enfoques posibles.

# INTRODUCCIÓN

---



## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1. Seguridad Alimentaria-Crisis Alimentaria**

La FAO, en su Cumbre Mundial para la Alimentación de 1996, celebrada en Roma, manifestó que existe Seguridad Alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico, social y económico a los alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfagan sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida sana y activa.

Cuando se produce un problema de Seguridad Alimentaria, se puede estar frente a un problema de Crisis Alimentaria, con escasez de alimentos y la consecuente subida de sus precios, incrementando los problemas de hambruna en los países en vías de desarrollo.

Este aumento de los precios de los alimentos, de los productos primarios agrarios, puede venir ocasionado por una serie de factores ligados a los propios medios de producción, como malas cosechas en determinados países “graneros” por problemas meteorológicos o fitopatológicos, como la grave sequía que está afectando actualmente al Cuerno de África y que está llevando a más de 11 millones de personas a una situación de extrema necesidad, y/o a factores estructurales entre los que se encuentran el aumento del consumo de los denominados países emergentes (India, China, Brasil, Asia Sudoriental), y a la nueva y potente demanda de las materias primas (alimentos) para la producción de biocombustibles, especialmente bioetanol (Chand, 2008).

En las Figuras 1 y 2 y Tabla 1, se muestran el significativo aumento de consumo de carne por parte de la población China, lo cual se traduce en un claro aumento de su demanda de productos primarios para la alimentación del ganado, demanda interna o externa, con las lógicas repercusiones en ambos casos; la evolución de los precios de los alimentos a escala mundial, según datos del 2011; y la evolución de materias primas para la producción de biocombustibles.

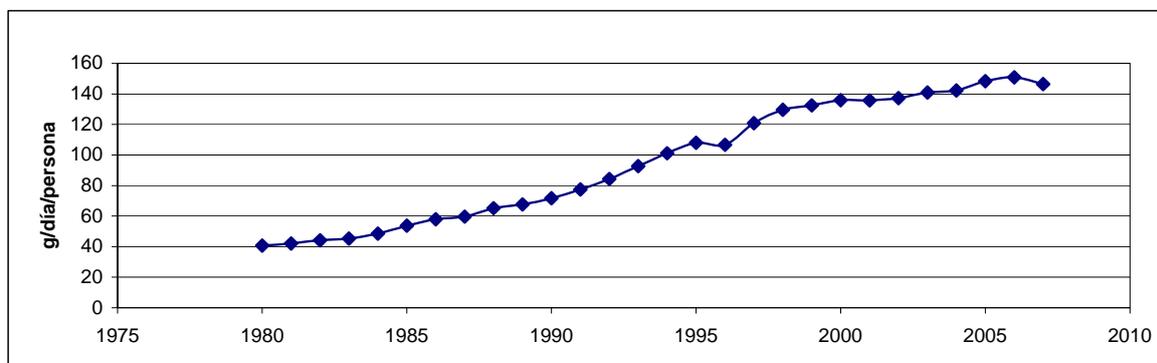


Figura 1: Evolución del consumo de carne en China del 1980 al 2007 (FAOSTAT)

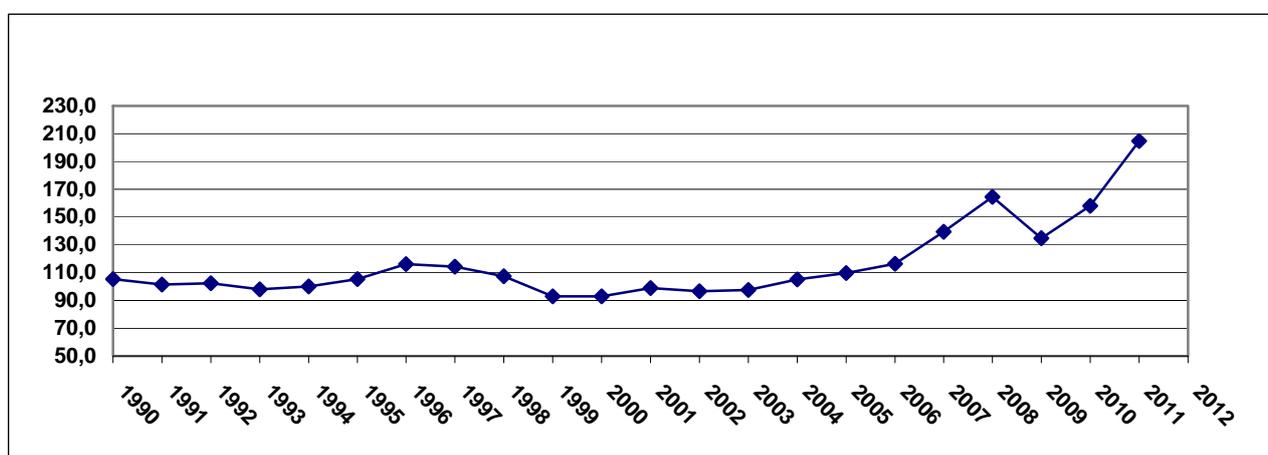


Figura 2: Índice de la FAO para los precios de los alimentos.

**Tabla 1: Uso del maíz para la producción de etanol en US (en millones de toneladas)**

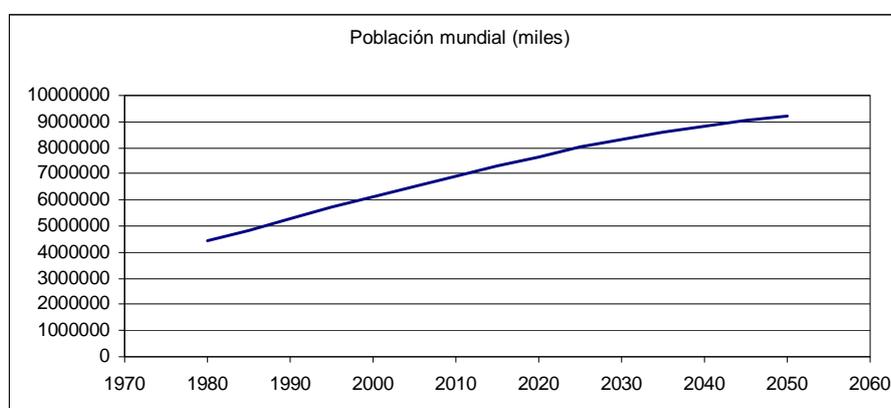
	2002-03	2007-08	2008-09
1 Maíz usado para la producción de etanol	27,1	81,6	108,9 #
2 (1) como % de la producción de US	11,9	24,6	32,8
3 (1) como % de la producción del mundo	4,5	11,6	15,4

**Nota:** Estimación prevista según el USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos).

**Recurso:** [http://www.fas.usda.gov/grain\\_arc.asp](http://www.fas.usda.gov/grain_arc.asp).

Estas causas, unidas a la fuerte especulación, además de todas aquellas que se quieran añadir, fueron las responsables de la drástica crisis alimentaria que se produjo en el año 2008, crisis que puede volver a producirse. Valores máximos de precios de productos básicos agrícolas, incremento en la demanda en el consumo de China, India y Brasil, mayor demanda de maíz en EEUU para la producción de bioetanol, subida del petróleo con la consecuente subida de los transportes (fletes de barcos), malas cosechas de cereal en Australia, pueden desembocar en catástrofe mundial.

Por otra parte, no se debe obviar el aumento de la población mundial, el cual se estima en más de 9 mil millones de personas para el 2050 (Figura 3), lo cual supone una mayor demanda de alimentos. Demanda que se debe de satisfacer no de cualquier modo, sino mediante medios productivos dentro de un marco de sostenibilidad social, económica y medioambiental, no es imaginable de otra forma en el contexto actual y futuro.

**Figura 3: Previsión del aumento de la población mundial.**

## **1.2. Nuevos desafíos-Nuevas Agriculturas.**

En este nuevo paradigma, es necesario producir más, en ambientes con indicios de tener climas cada vez más inestables y con fenómenos meteorológicos cada vez más extremos, más barato y dentro de sistemas más respetuosos de los que tradicionalmente se han utilizado. Este es el nuevo desafío de la Humanidad.

Diferentes estrategias de actuación son posibles, y distintas disciplinas y campos deberán de intervenir, ocupando la investigación agraria un lugar crítico.

Investigación y desarrollo en materia de semillas e insumos, riego, fertilizantes, transferencia, infraestructura rural, etc. deberán de potenciarse más que nunca. Es cada vez mayor el número de expertos y formuladores de políticas que coinciden en la importancia de aumentar las inversiones en agricultura, en particular en la generación de innovaciones a través de la inversión en investigación (Braun *et al.*, 2008). Inversiones encaminadas a nuevas formas de hacer agricultura que conserven y mejoren los recursos naturales y el medio ambiente, permitan la viabilidad económica de las explotaciones agrarias contribuyendo al bienestar de los agricultores y ganaderos, empleados y poblaciones rurales, consiguiendo abundantes alimentos para la población y para el ganado, fibras y combustibles (Reganold *et al.*, 2011)

En este contexto, y en la búsqueda de soluciones locales, de bajos insumos, que aporten diversidad a los sistemas agrarios, adaptadas al medio, competitivas se plantea este trabajo. En concreto sobre una especie perteneciente a la familia de las leguminosas que puede ocupar un importante lugar dentro de alternativas en sistemas de bajos insumos en condiciones de secano andaluzas. Esta especie es *Hedysarum coronarium* L. conocida comúnmente como zulla.

## **2. HEDYSARUM CORONARIUM L.**

### **2.1. Origen y referencias históricas de la especie.**

La zulla (*Hedysarum coronarium* L., syn. *Sulla coronaria* [L.] Medik.) es una planta de la familia de las leguminosas, originaria de la Cuenca Occidental Mediterránea (Talamuci, 1998; Issolah *et al.*, 2006). Linneo la llamó Zulla de España al considerarla oriunda de este país, aunque seguramente no era conocida en tiempos de los romanos, pues Columela no hace mención de ella, atribuyéndose su introducción a los visigodos, conociéndose más tarde en Sicilia y península italiana y después del siglo XIII, en Malta (Vidal y Vives, 1890).

A mediados del siglo XIX se intenta de una forma organizada propagar su cultivo por medio del Boletín Oficial del Ministerio de Fomento en 1853, consiguiéndose en zonas de Jerez y Menorca. Hasta el año 1870 su cultivo fue muy reducido, pero a partir de entonces se consiguió que se extendiera paulatinamente hasta alcanzar toda la isla de Menorca, siendo la base de todo su desarrollo ganadero tal y como se recoge en los trabajos de 1906 de Mir y Mir.

En la península intentos por cultivar la zulla fuera de la provincia de Cádiz se realizaron a finales del siglo XIX, probablemente coincidiendo con la recomendación del Ministerio de Fomento, antes citada. Desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX la zulla quedó limitada a la provincia de Cádiz y la isla de Menorca, aunque de forma casi testimonial en la provincia andaluza.

## **2.2. Taxonomía y morfología.**

El género *Hedysarum* pertenece a la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*), incluida en el orden *Fabales*, dentro de la clase Dicotiledóneas. Esta familia está constituida por plantas herbáceas, arbustivas y arbóreas con hojas esparcidas y compuestas con estípulas: sus flores están agrupadas en inflorescencias racimosas, zigomorfas (a excepción de la subfamilia *Mimosoideae* en las que son actinomorfas) y de corola papilionácea, con cinco pétalos, con prefloración vexilar, esto es: el mayor, llamado estandarte, es posterior y exterior, dos son laterales e interiores (alas) con respecto al anterior, y otros dos inferiores totalmente internos que acoplados constituyen la quilla (Bueno, 1979).

Este género es un miembro de la tribu *Hedysareae* que comprende también a los géneros *Caragana*, *Halimodendron*, *Ebenus*, *Onobrychis* (Sánchez-Monge, 2008) y se caracteriza por tener las hojas imparipinnadas y las flores de color púrpura, rosado, amarillo o blanco. Su legumbre es lomentácea, espinosa, inerme o tuberculada, glabra o pelosa.

El género *Hedysarum* L. esta formado aproximadamente por unas 100 especies distribuidas en las zonas templadas del Hemisferio Norte. Las plantas de este género existen en varios hábitat y esto hace que muestren variaciones en distintas características, como las relacionadas con sus vainas, hecho que ha sido considerado como el carácter de diagnóstico más importante para separar taxones infra-genéricos. Así, Candolle (1825) lo dividió en dos secciones, *Echinolobium* y *Leiolobium*, utilizando este carácter. Posteriormente, diversos autores se han ocupado de revisar esta clasificación (Basiner, 1845; Fedtschenko, 1902; Choi y Ohashi, 1996), destacando más recientemente a Choi y Ohashi (2003) que proponen un nuevo sistema infra-genérico para *Hedysarum* y le dan una nueva denominación a *H. coronarium* que pasa a ser denominada *Sulla coronaria* (L.) Medik.

Tradicionalmente a *H. coronarium* se le ha asignado como número cromosómico  $2n=16$ , pero en 2006, Issolah *et al.* en poblaciones naturales de Argelia encontró dos números cromosómicos,  $2n=16$  y  $2n=18$ .

Con respecto a su morfología se trata de una planta vivaz (bianual), bien de porte erguido, alcanzando alturas cercanas o superiores al metro, o porte más o menos rastrero en planta aislada. Se caracteriza por tener tallos cilíndricos y un sistema radicular muy potente, con la raíz principal pivotante muy desarrollada (en plantas de un año pueden alcanzar un diámetro de 2 a 3 cm) y raíces secundarias más superficiales. Ésta es una característica fundamental en el aspecto productivo, ya que la gran cantidad de reservas acumuladas en la raíz permiten un rebrote rápido, lo que es particularmente valioso en el comienzo del otoño, cuando las pratenses anuales están en sus primeras fases de germinación.

Las hojas son de inserción alterna imparipinnadas, de foliolos con pecíolo corto de forma ovalada, terminadas en uno normalmente de mayor tamaño que los demás. Los foliolos son blandos, suaves y de color verde algo oscuro en el haz y algo vellosos y más claros en el envés. Las flores van agrupadas en racimos siendo generalmente de color rojo púrpura, aunque se ha descrito la existencia de mutantes con flores de color blanco (Chriki *et al.*, 1982) (Figura 4). La planta aún siendo bianual, presenta floración desde el primer año, ocurriendo ésta en general en abril-mayo en condiciones andaluzas.



**Figura 4: Inflorescencias compactas de grandes flores púrpura y mutantes de flores blancas de *Hedysarum coronarium* L.**

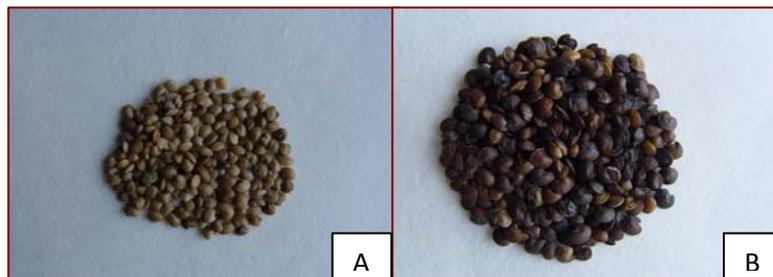
El fruto es un típico lomento compuesto por varias piezas articuladas, monosperma, indehiscente, erizada de pequeñas puntas (Figura 5). Gran parte de estas legumbres permanecen largo tiempo sobre el tallo lo que facilita mucho la recolección.



**Figura 5: Infrutescencia de *Hedysarum coronarium* L.**

Las semillas tienen forma lenticular más o menos redondeada, destacando la radícula saliente en pico curvo, con un peso que oscila entre 2 y 8 mg lo que supone como término medio unas 205.000-215.000 semillas por kg.

Las semillas recién formadas son de color amarillo o castaño claro (Figura 6.A). Las primeras, que permanecen así largo tiempo presentan un alto porcentaje de dureza (semillas con la cubierta impermeable) y son capaces de sobrevivir varias campañas de cultivo especialmente en ambientes caracterizados por lluvias imprevisibles en cantidad y distribución, logrando la persistencia de la leguminosa en condiciones silvestres (Taylor y Ewing, 1988; Sulas *et al.*, 1999). Bajo condiciones de domesticación, ésta es una cualidad no deseable (generalmente), obligando al agricultor a aumentar la dosis de siembra a valores exagerados, con objeto de asegurar una mínima nascencia e implantación en el terreno. Por el contrario las de color castaño se vuelven prontamente oscuras y presentan un alto porcentaje de germinación (Figura 6.B).



**Figura 6: (A) semillas de color crema típicas de zulla y con un alto porcentaje de dureza. (B) semillas de color marrón con alto porcentaje de germinación.**

### **3. AGRONOMÍA DE LA ESPECIE.**

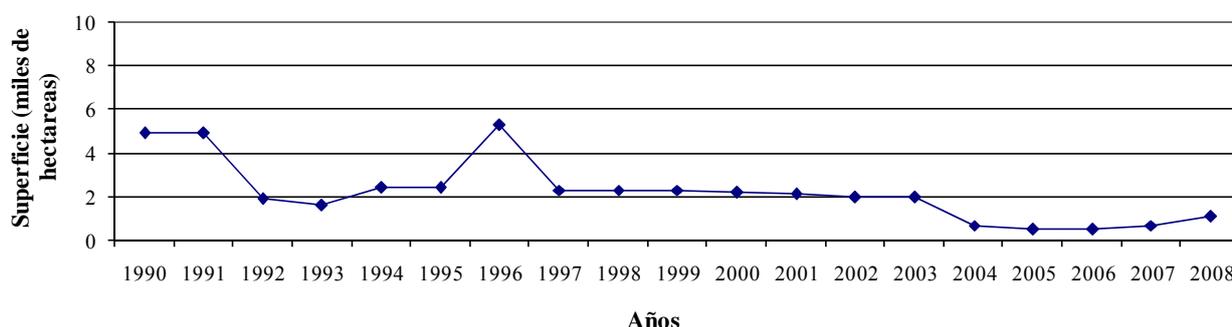
#### **3.1. Aspectos generales**

*H. coronarium* L. es la única especie de su género cultivada en la Cuenca Mediterránea (Boussaïd *et al.*, 1995). Su cultivo se distribuye principalmente por, España, Portugal, Italia, Grecia, Marruecos, Argelia y Túnez (Flores *et al.*, 1997; Trifi-Farah *et al.*, 2002). Su aprovechamiento es como cultivo forrajero de dos años para el pastoreo y/o para la producción de heno [forraje que ha sido conservado por desecación natural hasta alcanzar un contenido en humedad inferior a un 20 %, San Miguel, 2011] o ensilado [es un forraje que ha sido conservado por medio de un proceso de fermentación anaeróbica, con elevado contenido en humedad y con un mínimo de pérdidas de materia seca y nutrientes en el proceso (San Miguel, 2011)].

Actualmente existe un creciente interés en la zulla en áreas tradicionales y no tradicionales de su cultivo (particularmente en Nueva Zelanda y en Australia), debido a su excelente adaptabilidad a ambientes marginales y secos (Borreani *et al.*, 2003; Annichiarico *et al.*, 2008), a su versatilidad como cultivo forrajero (es usada para pastoreo y/o para producción de heno o ensilado y para pastoreo asociado a producción de heno), y por producir un forraje de buena calidad, con alto contenido en proteína (Bullitta *et al.*, 1996; Borreani *et al.*, 2003) y con niveles moderados de taninos condensados (Amato *et al.*, 2005). Además, otros usos han sido descritos: planta protectora del suelo (Watson, 1982), colonizadora y repobladora de tierras alteradas (Flores *et al.*, 1997), planta de aprovechamiento apícola etc.

Sin embargo, en España su cultivo parece estar en regresión ya que según los datos del MARM, la superficie cultivada en el año 2008 (últimos datos disponibles) fue de 1.060 ha, lo que representa alrededor del 0,11% de la superficie forrajera. Como puede verse en la Figura 7, en un periodo de 18 años, se han producido considerables variaciones de superficie, alcanzándose un máximo de superficie cultivada en 1996, con 5.300 ha.

**Figura 7: Evolución de la superficie cultivada (miles de hectáreas) de *Hedysarum coronarium* L. durante un periodo de 18 años.**



Actualmente el total de su cultivo es en seco, destinándose el 94,7% de la producción a ensilado, 4,9 % para consumo en verde y sólo el 0,4% para heno. La distribución de la superficie cultivada por provincias y comunidades autónomas se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 2: Análisis provincial de la superficie de *Hedysarum coronarium* L., 2008 (MARM)**

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (ha)			
	Cosechada		Pastada solamente	
	Secano	Regadío	Secano	Regadío
Baleares	1.023			
Valladolid	13			
Castilla y León	13			
Cádiz			24	
Huelva			24	
Andalucía			24	
<b>España</b>	1.036			24

### **3.2. Exigencias edafoclimáticas y ecológicas**

*H. coronarium* es una planta bianual, típica de zonas meridionales mediterráneas de inviernos suaves, dotada de una limitada resistencia a los rigores invernales y a las heladas primaverales (Ballatore, 1963). Le Houreou (1969) considera que es planta que necesita inviernos suaves y frescos (medias de las mínimas del mes de febrero superiores a 3°C), no estando adaptada al clima tropical, ya que los excesivos calores detienen su desarrollo. Olives (1967) considera que el clima óptimo es el templado mediterráneo, desarrollándose en alturas inferiores a los 400 metros sobre el nivel del mar. La limitada presencia en zonas de Menorca y Cádiz ha llevado a pensar que requiere especiales condiciones de medio para su correcta vegetación y desarrollo, considerando que necesita clima costero y alta humedad ambiental. Sin embargo, la altitud o un frío moderado de invierno no parecen ser demasiados condicionantes, ya que en Argelia la especie llega a los 1000 metros de altura (Issolah y Khalfallah, 2007) y en Sicilia se alcanzan los 900 m. (Ruisi *et al.*, 2010) con temperaturas mínimas de 3,3°C.

Respecto a sus necesidades de agua, la zulla es cultivada principalmente en condiciones de secano, como planta que aprovecha las lluvias de otoño, invierno y primavera, de forma que le favorecen las lluvias tempranas otoñales a principios de septiembre y prolongan su ciclo las tardías primaverales. Olives (1967) establece que sus necesidades de agua oscilan entre los 400 y 800 mm. anuales, límites bastantes amplios, siendo en este aspecto factor importantísimo el tipo de suelo respecto a su capacidad de retención de agua. Para su óptimo desarrollo necesita suelos arcillosos calcáreos, ricos y profundos, aunque se obtienen también buenos resultados de producción de forraje en terrenos pobres y compactos (Ballatore, 1963). A pesar de todo esto, en Menorca su cultivo se ha extendido por toda la isla, siendo ésta un muestrario de formaciones geológicas, adaptándose perfectamente a todos ellos. La opinión de que necesita suelos calcáreos ha sido generalizada, si bien parece ser que la condición indispensable es la presencia de calcio libre intercambiable (Romano, 1951). Moreno y Olea (1984) recomiendan para esta especie suelos de pH superiores a 6.5 y de textura franca a arcillosa.

#### **3.2.1. *Rhizobium* específico de la especie**

La idea general, hasta los años 70, era que las principales limitaciones para la difusión de la zulla eran de tipo edáfico y climático. Diversas experiencias han demostrado que es posible su

cultivo fuera de las áreas naturales donde vegeta, siempre que esté presente su *Rhizobium* específico: *Rhizobium sullae*.

Para que el cultivo de la zulla sea viable es necesario que haya en el suelo una densidad de bacterias suficientes. No todos los *Rhizobium* nodulan con todas las leguminosas, es decir, existe una gran especificidad entre la bacteria y la planta para formar la simbiosis efectiva, como es el caso de la zulla (Cabrera y Ruiz-Argüeso, 1979; Ollero *et al.*, 1989). Aclarada la alta especificidad del *Rhizobium* de la zulla es condición *sine qua non*, la preparación de la semilla, previo a la siembra, mediante la inoculación, siempre que no se encuentren en el suelo. La inoculación consiste en suministrar al terreno las bacterias propias de la planta, sin cuya presencia su implantación es difícil.

La primera descripción de bacterias aisladas de nódulos de zulla se remonta a finales de 1800 (Mottareale, 1898). En 1976 en el Laboratorio de Microbiología del INIA se fabricó el primer inoculante específico bajo la dirección del Dr. Santamaría. En años sucesivos el inoculante fue fabricado por el INIA en la planta de fabricación de inoculantes para leguminosas de San José de La Rinconada (Sevilla) a partir de las cepas inicialmente aisladas en el citado laboratorio. Hasta finales de la década de los 80 el laboratorio de inoculantes del CIFA Las Torres-Tomejil, perteneciente a la Dirección General de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de la Junta de Andalucía preparaba a escala semi-industrial, biofertilizantes para las leguminosas grano y forrajeras que se cultivaban en Andalucía o en otras regiones de España. El grupo de investigación dirigido por el Dr. Francisco Temprano Vera, formó una colección de estirpes de *Rhizobium sullae*, formada por 81 cepas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

El aislamiento del *Rhizobium* específico de la zulla, fue considerado como la llave maestra que abriría las puertas a nuevas zonas de cultivo de esta especie.

A lo largo de los años, la comunidad científica ha realizado diferentes estudios sobre el *Rhizobium* de *H. coronarium*, entre otros trabajos Rodríguez-Navarro *et al.* (1991) estudiaron la supervivencia de especies de *Rhizobium* en inoculantes de turba y los efectos beneficiosos de la inoculación de semillas, Orgambide *et al.* (1996) examinaron la diversidad de los glicoconjugados y lípidos celulares del *Rhizobium* “hedysari” IS123 y Squartini *et al.* (2002) describieron un nuevo taxon, *Rhizobium sullae* sp. Nov.

### 3.3. Formas de aprovechamientos

Como se indicó anteriormente, el aprovechamiento de la zulla puede ser como cultivo forrajero y/o para la producción de heno o ensilado o como cultivo pratense (Figura 8). En cuanto a su manejo, no existe un protocolo único y rígido pues dependerá de las diferentes formas de introducción de su cultivo en un determinado terreno. Olives (1967) señala que en ocasiones puede ser aprovechada durante un solo año, y en otras durante dos o tres, conociéndose casos de permanencia de la planta en un mismo terreno durante periodos de diez y quince años, mediante su auto-resiembra.

No existe una regla para establecer cuál es el tipo de aprovechamiento idóneo para el primer o segundo año del cultivo. Se ha sugerido que no es recomendable realizar un corte para heno o ensilado el primer año de cultivo ya que se debilitaría mucho si se cortara a finales de primavera y además los rendimientos en materia seca serían considerablemente superiores en el segundo año (De Koning *et al.*, 2008). Por otro lado, Bustamante *et al.* (2000) en la isla de Menorca recomienda un único corte el primer año para ensilar. Con esto podemos deducir que los tipos de aprovechamientos del cultivo dependerán de las condiciones edafoclimáticas y necesidades de la explotación y del sistema de alimentación y requerimientos de los animales.

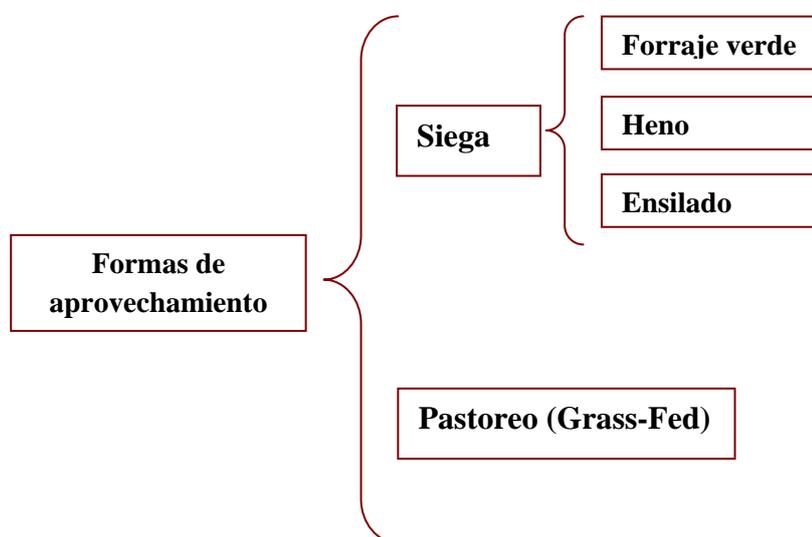


Figura 8: Principales formas de aprovechamiento de *H. coronarium*

Para el aprovechamiento mediante siega, es conveniente realizar el corte aproximadamente quince días después que empiece la floración tanto para forraje, como para heno y ensilaje (Anónimo, 1907). Las plantas deben de tener 50-60 cm (Olives, 1967) no siendo favorable hacerlo más tarde, especialmente si se hallan en floración avanzada ya que los tallos serían muy gruesos y con tendencia a lignificarse, produciéndose la pérdida de calidad y siendo menos digeribles por el ganado. Se ha determinado que no es conveniente realizar la siega de la zulla durante las épocas de mucho frío, y sobre todo, cuando sean posibles las heladas, las cuales perjudican enormemente los pies de las plantas segadas, que terminan por morir si la helada ha sido importante. Olives (1967) para las condiciones de Menorca, establece que la siega se debe de realizar a finales de invierno para el consumo de materia verde y si la climatología fuera buena en ese año se podría hacer un segundo aprovechamiento a finales de mayo para la obtención de forraje o de semilla. En los casos que se destine a ensilaje o henificación, la siega se haría en los meses de abril-mayo.

En base a los diferentes estados fenológicos del cultivo, Bustamante *et al.* (2005) sugieren que el aprovechamiento del forraje mediante siega se debería de realizar en el estado de botones florales para conseguir un equilibrio entre cantidad y calidad del mismo. Y si el destino fuera su ensilado el porcentaje de materia seca del forraje sería su factor limitante por lo que habría que retrasar su siega al estado de floración.

Es un cultivo de alto rendimiento con 14.000 kg/ha materia seca (MS) por campaña (Stringi *et al.*, 1997; Douglas *et al.*, 1999) con producciones que oscilan entre 20.000-30.000 kg/ha en el corte por siega efectuado en primavera, obteniéndose de 8.000 a 15.000 kg más, en el segundo corte, o sea, a finales de mayo (Olives, 1967). Estudios realizados por Bustamante *et al.* (2000) en el Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Mahon (Menorca) mostraron producciones de 45.000 kg/ha de forraje verde, con un contenido del 16% de MS para el primer año y 50.000 kg/ha de forraje con el 18 % de MS para el segundo año del cultivo. En los dos años del cultivo se hizo sólo un aprovechamiento en primavera para ensilar. Resultados similares fueron obtenidos por Amato *et al.* (2007) y Ruisi *et al.* (2010) con 7.800 kg/ha y 8.000 kg/ha de MS en el primer año, respectivamente.

En España, el ensilado de zulla es el aprovechamiento más utilizado destinándose más del 94 % de la producción total de verde (33.339 t) (MARM 2008). El nitrógeno de amonio como una fracción del nitrógeno total y la concentración de los ácidos láctico, propiónico y butírico son característicos de un ensilaje de buena calidad (INRA, 1978). El ensilaje con gran contenido de zulla (por ejemplo el 75% y valores superiores) incrementa los niveles de ácido láctico, lo que produce una reducción de la concentración de amoníaco y un pH más bajo obteniéndose un ensilaje de alta calidad. Estudios

realizados por Bustamante *et al.* (2005), para estudiar el valor nutritivo del ensilado de zulla en zullares de secano cultivados en Menorca, muestran bajos contenidos de MS, un contenido de fibra bruta elevado (35%) y de calidad fermentativa deficiente, la cual es evaluada a través del pH ( a menor pH mayor calidad). Por otra parte los contenidos medios de proteínas obtenidos estuvieron alrededor del 14 % (Bustamante *et al.*, 2005). Estos autores sugieren un aumento de la MS mediante la siembra en una misma parcela de zulla y cebada aumentando así su calidad, conservación y la aceptación por parte de los animales.

La henificación de la zulla no presenta dificultades especiales y su heno tiene un gran valor nutritivo y es muy apetecible para el ganado. La zulla bien henificada posee una riqueza proteínica elevada, con un valor nutritivo muy próximo al del buen heno de alfalfa. En cuanto a rendimientos, éstos variaran mucho según la calidad del terreno y edad del zullar. Los más elevados se pueden obtener en suelos arcillo-calizos profundos con producciones de 13.000 a 15.000 kg de heno por hectárea. Se considera que el peso del heno de zulla es igual a un tercio del forraje de origen (Olives, 1967).

Leto *et al.* (2002) realizaron un estudio en el que compararon el heno y ensilado de zulla. La composición de proteínas, cenizas y fracción de fibra fue similar en ambos casos, encontrando diferencias significativas en el % MS, 21,36 % para el ensilaje y 91,64 % para el heno de zulla.

Otro tipo de aprovechamiento es el pastoreo. En el año de establecimiento de la zulla ya podría ser ligeramente pastada asegurando un buen desarrollo de la raíz y el número de plantas para el segundo año. El pastoreo rotacional es la mejor estrategia para praderas basadas en esta especie. El período de descanso entre el pastoreo es más largo que el requerido para la alfalfa y puede variar desde 35 hasta 85 días (rebrote de 30-40 cm de altura). Este depende del nivel de humedad, de la duración del día y de la temperatura del suelo. La mayor riqueza en proteínas se encuentra, como es sabido, en la hierba joven y por lo tanto debe de establecerse una adecuada rotación del pastoreo, siendo ideal la altura de 30-40 cm, lográndose con ello el máximo aprovechamiento de la riqueza alimenticia de la zulla, no debiéndose pastar por debajo de 10 cm. ya que esto demoraría el rebrote.

Bustamate *et al.* (2005) en base a los resultados que obtuvo de la valoración bromatológica de zullares de más de un año en Menorca, estableció que el aprovechamiento a diente se debería realizar antes del estado de yemas florales (planta en fase inicial de abotonamiento) para poder obtener la mayor calidad del mismo.

### **3.4. Labores culturales**

#### **3.4.1. Fecha de siembra y dosis adecuada**

Con respecto a las labores culturales, la elección de la fecha de siembra es un aspecto de manejo muy importante, ya que se relaciona directamente con el rendimiento del cultivo. Ésta ha sido fijada por varios autores, estando condicionada por la climatología de cada región. Algunos de estos trabajos como el texto “La zulla: la reina de las forrajeras de secano”, publicado en 1907 estableció como época más adecuada el otoño en los “países cálidos” y la primavera en los “menos cálidos” evitando en este último caso la muerte de plantas jóvenes a consecuencia de los fríos invernales. Posteriormente, Olives (1967) propuso los meses de octubre a diciembre, y estudios más recientes realizados por Bustamante *et al.* (2000) en la isla de Menorca establecieron como época de siembra a principios de septiembre para aprovechar al máximo las lluvias de otoño.

El pequeño tamaño de su semilla ha obligado tradicionalmente a realizar una buena preparación del suelo, persiguiendo dos objetivos principales: romper el subsuelo mediante una labor profunda, para que las raíces de las plantas puedan penetrar y preparar la parte superior del suelo para que la tierra quede suficientemente desmenuzada para recibir la semilla.

Se debe sembrar de 1 a 2 cm de profundidad sobre la base de un suelo franco y sin duda no más de 3 cm ya que el establecimiento de plantas se reduce significativamente cuando se siembra por debajo de esta profundidad (De Koning *et al.*, 2008).

El peso de las semillas es variable, y esta variabilidad va a depender, entre otras cosas del genotipo, del manejo y del año agrícola en que se desarrolló el cultivo, de la zona o lugar de obtención de la semilla y de la climatología, por lo que la dosis de siembra (kg/ha) puede variar dentro de unos márgenes no muy amplios pero que tienen una gran importancia a causa del precio actual de la semilla (alrededor de 8 euros/kg). Por otro lado, la cantidad de semilla empleada en la siembra variará, según se trate de semilla descascarillada o con vaina. Para semilla descascarillada, las dosis recomendadas van desde los 5-10 kg/ha recomendados por De Koning *et al.* (2008), 10-15 kg/ha por Montes (1994) o de más de 25 kg/ha por Bustamante *et al.* (2000) y Anónimo (1907). Sulas y Ledda (2008) realizaron un estudio en el Norte de Cerdeña (Italia) para determinar los efectos de diferentes dosis de siembra (10, 20 y 30 kg/ha) en la producción de semilla y componentes de la zulla e identificar la densidad de plantas óptima. Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas entre las dosis de siembra utilizadas y confirmaron los obtenidos

por Douglas y Foote (1985) en Nueva Zelanda que tampoco observaron diferencias, tan sólo pequeñas ventajas al incrementar esta.

### **3.4.2. Fertilización del cultivo.**

Varios estudios (Anónimo, 1907; Olives, 1967; Montes, 1994; Bustamante *et al.*, 2000) relacionados con el abonado coinciden en la necesidad del aporte de fertilizantes antes de la siembra. Algunos autores han realizado investigaciones para determinar la respuesta de la zulla a los diferentes tipos de fertilizantes. Karlovsky *et al.* (1971) y Ratera *et al.* (1976) estudiaron las necesidades de fósforo, potasio y microelementos en zullares de tres años, situados sobre un suelo arcilloso que no había sido fertilizado anteriormente, en la provincia de Cádiz. En contra de lo esperado, no obtuvieron respuestas a estos elementos. Con respecto a las aportaciones de fósforo no se observaron diferencias en la producción de forraje y tampoco obtuvieron respuesta al abonado potásico, aunque esto fue explicado por el alto contenido de potasio del suelo (464 p.p.m.).

Los ensayos que fueron realizados por Dr. Mir Mateo en el Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Menorca, revelaron también una falta de respuesta al fósforo y al potasio, para altos niveles de fertilización (dosis comprendidas entre 150 y 270 unidades de cada elemento). Anastasi y Santonoceto (2000), en un estudio más reciente evaluaron la respuesta a la fertilización fosfórica en el sur de Italia durante un periodo de dos años (1991-1992). Se compararon tres tratamientos de fertilización: 50, 100 y 150 kg/ha de  $P_2O_5$  y un control sin fertilizar, en una combinación factorial con tres tratamientos de dosis de siembra: 25, 50 y 75 kg/ha de semillas respectivamente. En ese caso y en esas condiciones, los resultados obtenidos mostraron que el uso de cantidades reducidas de fertilizantes fosfóricos produjeron un incremento en el rendimiento de la materia seca comparado con el control sin fertilizar, especialmente en el estado de floración. Por otra parte, no se encontraron incrementos en la productividad al suministrar cantidades mayores de este tipo de fertilizantes. También obtuvieron una mayor producción al final del ensayo con el uso de cantidades superiores de semillas.

En cuanto a posibles respuestas de la zulla a la aplicación de nitrógeno, no se conocen resultados de ensayos realizados en el Sur de España y la única referencia conocida es la de Mir Mateo en Menorca. La producción de forraje verde por hectárea fue determinada para el primer año y el segundo año del cultivo. Diferentes dosis de kg N/ha (0, 20 y 40) fueron aplicadas y se obtuvieron

diferencias en la producción forrajera, mostrando que la zulla tuvo una reacción al aporte de fertilizante nitrogenado (González de Tánago *et al.*, 1981).

### 3.4.3. Problemas de estreses bióticos.

La zulla es planta generalmente poco afectada por plagas y enfermedades, señalando Pecchioni en su obra “La Industria Agraria” que el único enemigo de la zulla era el frío. En el texto “La zulla: la reina de las leguminosas forrajeras”, se puso de manifiesto que podía ser dañada por parásitas e insectos. Se enumeraban tres patologías principales como las ocasionadas por *Uromyces appendiculatus*, *Erysiphe martii* y *Cercospora ariminensis* y se hacía mención del *Oidium leucoconium*, de un *cladosporium* y una *Phoma hedysari*. Olives (1967) también hace referencia a plagas de gorgojos, caracoles, babosas, *Agrotis segetis* y *Prodenia litura*. En Australia, donde la zulla es ampliamente cultivada, la información referente a plagas y enfermedades ha sido limitada, mencionando a *Bruchophagus roddi*, *Helicoverpa species*, *Halotydeus destructor*, *Rhizoctonia solana*, *Phoma blight* y el oidio (De Konning *et al.*, 2008), siendo este último un problema muy común en Italia.

Sin embargo, recientes estudios han puesto de manifiesto que la zulla puede ser atacada por la planta parásita *Orobanche crenata* Forsk. (jopo) (Figura 9), principal limitante de muchas de las leguminosas de grano cultivadas tradicionalmente en el sur de España (Córdoba *et al.*, 2008).



**Figura 9:** *Hedysarum coronarium* L. afectada por la planta parásita *Orobanche crenata* Forsk. (jopo).

*Orobanche* pertenece a la familia *Orobanchaceae* que se caracteriza por estar constituido por plantas sin clorofila. Es el género que contiene más especies dentro de la familia, parasitando tanto a especies cultivadas como silvestres. Engloba más de 100 especies, pero solamente cinco de ellas afectan gravemente a cultivos: *O. aegyptiaca*, *O. crenata*, *O. cumana*, *O. minor* y *O. ramosa* (García-Torres, 1993; Parker y Riches, 1993).

Para el control del jopo se han desarrollado varias estrategias. Entre estas figuran, las culturales [rotaciones de cultivos, adelantar o retrasar la fecha de siembra, la solarización, etc (Krishnamurthy y Rao, 1976; Mauromicale *et al.*, 2001; Pérez de Luque *et al.*, 2004; Grenz *et al.*, 2005)], las de tipo químico [aplicación de herbicidas convencionales, estimuladores de la germinación (Jacobsohn y Kelman, 1980; Sauerborn *et al.*, 1989; Jurado-Éxposito *et al.*, 1999; Galindo *et al.*, 2002; Nadal *et al.*, 2005)], el control biológico [utilización de insectos, hongos (Thomas *et al.*, 1999; Norambuena *et al.*, 2001)] y la mejora por resistencia, que es hasta el momento la más económica, fiable, y respetuosa con el medio ambiente de todas. Desafortunadamente, en general, la resistencia a *O. crenata* es escasa y de naturaleza compleja en la familia de las leguminosas (Cubero y Hernández, 1991), lo que dificulta los trabajos de mejora por resistencia a jopo en estos cultivos.

Diferentes niveles de resistencia a *Orobanche* spp. han sido descritos en melón, berejena, colza, tabaco, mostaza y tomate (Kasrawi y Abu-Irmaile, 1989). En habas se ha detectado un cierto nivel de resistencia a *O. crenata* (Nassib *et al.*, 1978; Cubero y Moreno, 1979), siendo dicho nivel bastante alto en una línea egipcia. En este caso la resistencia parece estar asociada con la forma del crecimiento de la raíz (Nassib *et al.*, 1982) pero tal sugerencia no ha tenido confirmación.

Teniendo en cuenta el problema que representa para muchas leguminosas esta planta parásita sería necesario conocer la susceptibilidad-tolerancia-resistencia de la zulla a esta, previo a su implantación como alternativa de cultivo, pues podría ocurrir una situación similar a la acontecida en el guisante en Andalucía en el año 1996. En 1995/96 la superficie cultivada de guisante fue aproximadamente de 32.000 ha, disminuyendo a partir de esos años a menos de 8.000 ha. Severos ataques de jopo fueron los principales responsables de este descenso (Rubiales *et al.*, 1999). Estos serios contratiempos suponen un abandono del cultivo por los agricultores, situación que es de difícil cambio.

#### **4. CALIDAD NUTRITIVA**

El término “calidad” ha sido definido como “propiedad o conjunto de propiedades inherentes a una cosa, que permiten apreciarla como igual, mejor, o peor que las restantes de su especie” (Pérez, 2003). Sin embargo dicha valoración en función de las propiedades inherentes no tiene carácter absoluto. Por ejemplo, un determinado genotipo de zulla con un porte erguido, tallos gruesos y fuertes, y elevado potencial de rendimiento de materia seca y semilla sería evaluado por un agricultor como de alta calidad si se destinara como alimento para el ganado, mientras que si se evaluase, por el mismo agente, para proteger y cubrir el suelo, como cubierta vegetal, posiblemente no alcanzaría el mínimo valor admisible. Además, en función del agente que evaluase, de sus requerimientos, el resultado de dicha evaluación podría ser diferente. Por lo tanto, el concepto por sí solo es ambiguo, necesiéndose en la mayoría de los casos una precisión del uso-destino de la especie que estamos estudiando.

La calidad del forraje se define de varias maneras, pero a menudo es mal comprendida. Representa un concepto simple, pero que abarca una gran complejidad y aunque la calidad del forraje es muy importante a menudo recibe menos consideración de la que merece. Wesley Colbert (2009) la define como la capacidad que tiene el forraje para cumplir los requerimientos nutricionales del animal

Una alimentación animal adecuada es esencial para obtener altas tasas de ganancia de peso, suficiente producción de leche, una eficiente reproducción, y unos beneficios adecuados, por lo tanto la calidad del forraje va a tener efectos directos en todos estos parámetros.

La calidad va a ser muy variable entre y dentro de los cultivos forrajeros, y las necesidades nutricionales varían entre y dentro de las especies y clases de animales, por lo tanto para obtener una adecuada producción de forraje de calidad en una situación dada, es necesario conocer los factores que afectan la calidad de dicho forraje y después realizar un buen manejo de acuerdo a dichos factores. Los análisis de forrajes para evaluar su contenido de nutrientes se pueden utilizar para determinar si la calidad es adecuada y así guiarnos hacia cuál sería la adecuada ración a suplementar a los animales. En los últimos años, los avances en la mejora de plantas y animales, de nuevos productos y el desarrollo de nuevos enfoques de manejo han hecho posible el aumento del rendimiento de los animales. Sin embargo, para que esto se lleve a cabo, también debe haber un enfoque adicional en la calidad del forraje.

Ball *et al.* (2001) y Wesley Colbert (2009) establecieron que los factores que influyen en la calidad del forraje eran los que se describen a continuación:

- **Palatabilidad.** Se conoce con este nombre al grado de apetencia en virtud de la cual los animales pueden cumplimentar sus funciones de mantenimiento y producción. Integra varios fenómenos que incluyen olor, sabor y textura además de efectos nutritivos y tóxicos (Preston y Leng, 1989; Provenza, 2007). Usualmente un forraje de alta calidad es altamente palatable.
- **Consumo.** Los animales deben consumir cantidades adecuadas de forraje para desarrollarse bien. Normalmente, cuanto mayor es la calidad y la palatabilidad del forraje más alto es el consumo.
- **Digestibilidad.** Es una importante medida del valor nutritivo del forraje e indica la cantidad de un alimento que se degrada y absorbe mientras pasa a través del tracto digestivo del animal (Sierra Posada, 2005). Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de digestibilidad de un nutriente} = \frac{\text{Cantidad de nutriente consumido} - \text{Cantidad de nutrientes en las heces}}{\text{Cantidad de nutriente consumido}}$$

La digestibilidad de los forrajes está determinada por tres factores principalmente (el animal, el forraje, y el consumo) los cuales tienen varios componentes que determinan en qué grado estarán afectando. El animal por su estado fisiológico, y por sus hábitos alimenticios pueden modificar de alguna manera la digestibilidad, además algunas poblaciones de microorganismos pueden estar en unos animales y no en otros. El forraje y su composición físico-química, sobretodo el contenido de pared celular y grado de lignificación por madurez determinarán en parte la digestibilidad del forraje (Norton, 1993; Dzowella *et al.*, 1995), algunos otros componentes inherentes al forraje como factores antinutricionales, especie, y la forma en que fijan los compuestos carbonados, también el procesamiento y forma de almacenamiento van a alterar la digestibilidad. La fertilidad del suelo también causa efectos en el crecimiento y desarrollo del forraje haciendo más fibroso el componente estructural de la planta. El consumo voluntario va a estar determinando la tasa de paso del forraje la cual afecta la digestibilidad ya

que a mayor tiempo de permanencia en el tracto, mayor será la probabilidad de degradación por parte de los microorganismos.

- **Contenido de nutrientes.** Las plantas de forraje vivas contienen del 70 al 90 % de agua. Para estandarizar los análisis, el rendimiento del forraje y el contenido de nutrientes se expresan normalmente en base a la materia seca. La materia seca del forraje se puede dividir en dos categorías principales: (1) componentes celulares (las partes no estructurales de los tejidos de la planta como proteínas, azúcares y almidón); y (2) componentes estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina)

Uno de estos nutrientes, en concreto, la proteína bruta (PB) es a menudo usada como criterio para adjudicar el valor nutricional de los cultivos forrajeros. Las leguminosas en general, tienden a conservar sus niveles de PB en altas concentraciones, mejor que las gramíneas, ya que estas últimas disminuyen su valor nutritivo después de 3 meses de crecimiento y en cambio en las leguminosas los niveles de proteína descienden con menor rapidez. Esto se debe en parte a la habilidad de fijación de N<sub>2</sub> atmosférico de la bacteria *Rhizobium* en simbiosis con la leguminosa y la incorporación del nitrógeno en el suelo a través del reciclaje de materia orgánica.

El contenido de proteína bruta es muy importante, pues se sabe que cuando este nivel es inferior al 7% de la materia seca, la utilización del forraje (digestibilidad) a escala de rumen se ve limitada a causa de una deficiencia de nitrógeno para el crecimiento bacterial. En cambio, cuando los forrajes contienen niveles superiores al 7% se obtiene una respuesta aceptable en producción animal y en la utilización del forraje al nivel del rumen (Sierra Posada, 2005).

Esta importancia se traduce en el incremento o decremento del precio del forraje en función de aumentar o disminuir su contenido proteico.

- **Factores antinutritivos o “no nutritivos”**

La limitación mayor del uso de los forrajes en la dieta animal y particularmente en las leguminosas es la presencia de factores antinutricionales (FANs). Los FANs son compuestos químicos generados por las plantas, que influyen en la aceptabilidad animal (Ahn *et al.*, 1997), inhiben la digestión al afectar la actividad catalítica de algunas enzimas (Delgado, 1998), producen efectos tóxicos (Midjavila, 1990) y limitan la absorción de los alimentos (Liener, 1997) contribuyendo por todo ello a un efecto negativo sobre los valores nutritivos.

Su efecto nocivo ha sido ampliamente investigado, sin embargo recientes estudios epidemiológicos han demostrado que muchos de estos compuestos pueden ser beneficiosos, en determinadas cantidades, para los animales y para las personas. Esta es la razón por la que actualmente se les denomina compuestos no-nutritivos o compuestos nutricionalmente activos ya que aunque influyen sobre el valor nutritivo, estos compuestos no son siempre nocivos (Muzquiz *et al.*, 2006).

Desde antiguo se han clasificado en función de su estructura química: derivados de proteínas o aminoácidos, glucósidos y varios. Otra clasificación, se basa en función de que se degraden o no tras aplicación de tratamientos térmicos, clasificándose como termolábiles (inhibidores de la proteasa, cianógenos, factores antivitaminas, taninos condensados entre otros) o termoestables (alcaloides, saponinas, flaonas e isoflavonas, los glucósidos de pirimidina, etc).

Varios de estos compuestos pueden estar presentes en los forrajes pudiendo reducir el rendimiento de los animales, causar enfermedades e incluso la muerte. La presencia o severidad de estos elementos dependen de las especies de plantas presentes (incluyendo malas hierbas), de la época del año, de las condiciones ambientales y de la sensibilidad del animal. Los forrajes de alta calidad no deben contener niveles perjudiciales de componentes antinutricionales.

#### ▪ **Taninos**

En la segunda mitad del siglo XX y en los primeros años del nuevo milenio es cuando se han llevado a cabo la mayor cantidad de estudios con taninos, debido fundamentalmente a que diversas líneas de investigación relacionadas con la alimentación animal y humana, la ciencia de los materiales, la farmacología, la cosmética y la medicina han descubierto, a partir de sus propiedades singulares, numerosos usos y beneficios.

El interés creciente en la comprensión de sus características pro-nutricionales/tóxicas ha derivado de la búsqueda de nuevos alimentos suplementarios para el ganado, fundamentalmente en especies leguminosas como alternativas viables por su específica composición química y elevado valor nutritivo

Las leguminosas forrajeras han sido consideradas como una promesa, particularmente cuando contenían niveles moderados de compuestos secundarios como los taninos condensados y los flavonoides (Barry y Mc Nabb, 1999; Aoki *et al.*, 2000).

Los taninos son compuestos fenólicos de peso molecular alto que oscilan entre 500-3000 Da y que contienen un gran número de grupos hidroxilo capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas, precipitándolas (Gupta y Haslam, 1979). Según su estructura y reactividad hacia los agentes hidrolíticos se clasifican en tres grupos: (1) los hidrolizables que son polímeros de ácido gálico o ácido hexahidroxidifenólico, ésteres de glucosa y otros polifenoles que rápidamente son degradados en grupos fenólicos más pequeños, incapaces de reaccionar con las proteínas del medio (Hagerman *et al.*, 1992), (2) las proantocianidinas (taninos no-hidrolizables o condensados) que son sintetizadas por la vía metabólica de los flavonoides (Paterson, 1993) e interactúan con las proteínas formando complejos y (3) los florotaninos que se han aislado de diversas especies de algas pardas (Shin *et al.*, 2006) y que derivan por la vía de la malonil coenzima-A que produce la unidad funcional (floroglucinol) para la síntesis de los florotaninos (Samappito *et al.*, 2002). El tipo y el contenido de los taninos y otros metabolitos secundarios, están influenciado por el genotipo de la planta (especie y la variedad), las características ambientales (radiación solar y disponibilidad de agua), la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades, etc (Romero *et al.*, 2000)

- **Rendimiento de los animales.** Es la última prueba de la calidad del forraje especialmente cuando los forrajes son consumidos solos y a libre elección. La calidad del forraje abarca “el valor nutritivo” que es el potencial del forraje para el suministro de nutrientes, es decir, la digestibilidad y contenido de nutrientes. El rendimiento de los animales pueden verse influenciado por varios factores que pueden estar asociados a los animales o a las plantas y no dar la debida consideración a alguno de estos factores puede reducir el nivel de rendimiento de un animal, que a su vez reduciría los ingresos potenciales

Un mejor conocimiento de la morfología de desarrollo y cambios en la calidad de la zulla en diferentes ambientes es necesario para optimizar su potencial para la producción ganadera. Por este motivo diferentes estudios a lo largo de los años se han realizado para evaluar la calidad de su forraje.

Uno de los factores más importantes que definen el valor nutritivo del forraje como indicamos anteriormente era la digestibilidad. Maymone *et al.* (1951) establecieron que la digestibilidad aparente de la zulla al inicio de la floración era superior a la alfalfa (*Medicago spp.*) y semejante al trébol rosa (*T. pratense L.*), que es considerado de los más digestibles.

Por otra parte, la zulla tiene un gran valor nutritivo (Terrill *et al.*, 1992; Molle *et al.*, 2003) similar a la alfalfa, sin el riesgo de producir meteorismo (enfermedad de los rumiantes debida a la

acumulación excesiva de gases en la panza y retículo). Su valor nutritivo disminuirá en primavera si no es cortada o pastada, sin embargo, si ha sido pastoreada durante el invierno, el valor nutritivo que tendrá en primavera será relativamente alto debido al aumento de la proporción hojas/tallos. El valor de los pastos de zulla cuando el pastoreo se realiza a mediados de la primavera, es mucho mayor que el de los pastos de hierba/trébol, proporcionando un mayor volumen y valor nutritivo durante un periodo de tiempo mayor. Pastos formados por zulla en el sur de Australia produjeron 6,4 t/ha de MS total, a finales de octubre del 2009, produciendo al mismo tiempo pastos de cebada/trébol 4,9 t/ha de MS. El valor nutritivo de los componentes de la zulla fue relativamente alto (proteína cruda 16,5%, digestibilidad 68%, fibra neutro detergente 42,8% y 10,1 de energía metabolizante MJ/kg/DM) comparados con los pastos de cebada/trébol (proteína cruda 14,6%, digestibilidad 61,5%, fibra neutro detergente 55,6% y 9 de energía metabolizante MJ/kg/DM) (De Koning *et al.*, 2008).

Bustamante *et al.* (2003) estudiaron la evolución del valor nutritivo de la zulla en sus diferentes estados fenológicos, durante su primer y segundo año de cultivo en secano, en diferentes predios de Menorca. Los resultados que obtuvieron mostraban que el contenido de MS se incrementaba al aumentar el grado de madurez de la planta, siendo estos valores superiores el segundo año al tener las plantas más tallos y estar más lignificados. Los contenidos de fibra bruta (FB), fibra ácido detergente (FAD) y fibra neutro detergente (FND) también aumentaron con el grado de madurez, y siguieron siendo mayores en el segundo año de cultivo. Por el contrario el contenido de PB disminuyó al aumentar el grado de madurez, siendo muy rápido al pasar de hojas (24% PB) a yemas florales (17% PB), y luego disminuyó, aunque de forma más lenta, hasta el estado de fructificación. Los valores fueron muy similares hasta el estado de botones florales para los dos años, siendo inferiores a partir de este estado fenológico en el primer año.

Resultados similares fueron obtenidos por Borreani *et al.* (2003) mostrando el alto valor nutritivo en términos de proteína bruta y digestibilidad de la materia orgánica de la zulla.

En relación al contenido de nutrientes, habría que destacar que la zulla tiene una alta concentración de carbohidratos solubles (18-25% MS) (Burke *et al.*, 2004) y por otra parte contiene taninos condensados (factores antinutricionales) que son la mayor limitación del uso de los forrajes en la dieta animal.

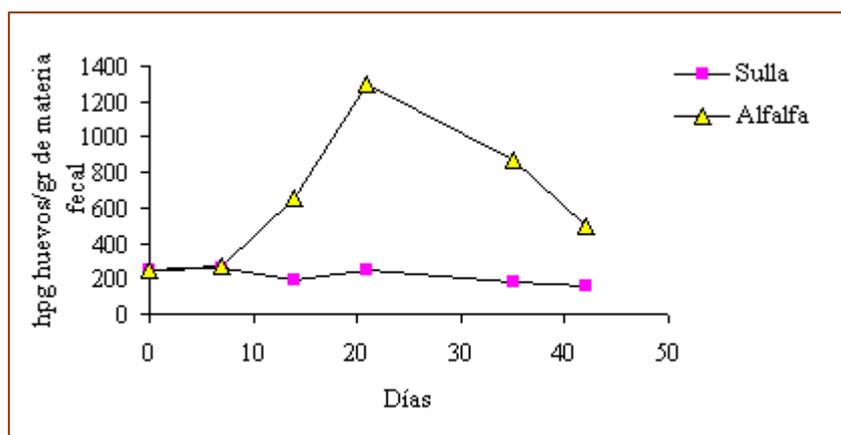
*H. coronarium* es una leguminosa cuyos efectos beneficiosos, entre otros aspectos, han sido atribuidos a sus niveles moderados de taninos condensados (TC). En ambientes mediterráneos, el contenido de TC en la zulla muestran una gran variabilidad, de 8 a 50 g/kg MS, dependiendo de la

etapa fisiológica, del ambiente y del genotipo, existiendo además una significativa interacción genotipo x ambiente (Anuraga *et al.*, 1993; Springer *et al.*, 2002; Amato *et al.*, 2005).

Cuando los forrajes contienen altos niveles de TC (6-10 % de la MS), estos pueden formar fuertes complejos con las proteínas de la dieta, deprimir el consumo voluntario de alimentos, la palatabilidad, la utilización de nutrientes y la productividad de los rumiantes (Otero y Graciela, 2004). En cambio, si contienen niveles moderados de TC como es el caso de la zulla (2-4 % de la MS) previenen el meteorismo, reducen la degradación de la proteína del forraje en el rumen e incrementan el paso de ésta y algunos aminoácidos esenciales al intestino delgado (Min *et al.*, 2003; Waghorn y McNabb, 2003) mejorando así la utilización de la proteína y el rendimiento de los animales.

Por otra parte, la ingesta de TC a partir de plantas taníferas parece proporcionar una solución parcial al control de los parásitos gastrointestinales de los rumiantes en pastoreo, a través de sus efectos en el ciclo de vida de estos parásitos (Hoste *et al.*, 2006).

La infección por nematodos que causa considerables pérdidas de productividad y reduce los beneficios de los rumiantes de pastoreo ha sido tradicionalmente controlada a través de tratamientos químicos antihelmínticos. En los últimos años, el aumento de la preocupación social por los residuos de medicamentos en los productos animales, la resistencia desarrollada por las poblaciones de nematodos a los fármacos antihelmínticos (Jackson *et al.*, 2000) y la tendencia hacia una agricultura sostenible y ecológica ha llevado a reducir o excluir el uso de estos fármacos. Por consiguiente, métodos alternativos para el control de los nematodos han sido explorados y propuestos (Waller y Thamsborg, 2004; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005), entre los cuales está el uso de plantas bioactivas con propiedades antihelmínticas. De esta manera se ha demostrado que el consumo de forraje de zulla que contiene TC, así como otras leguminosas con niveles moderados de estos compuestos, reducen los parásitos gastrointestinales en ganado lanar (Niezen *et al.*, 1995, 2002). En la Figura 10, Niezen *et al.* (1995) muestran las diferencias encontradas en el número de huevos de parásitos contados por gramo de heces en corderos (hpg) en función de los diferentes recursos forrajeros consumidos. Cuando el recurso forrajero fue zulla, el hpg disminuyó y se mantuvo bajo hasta la finalización del ensayo, presumiblemente debido a un efecto de resistencia de los animales afectados a la infección de los parásitos. El total de parásitos que se encontraron dentro de las seis semanas posteriores a la infección fue menor en los que se encontraban pastoreando zulla (siendo los valores de 8.016 y 19.268 para zulla y alfalfa respectivamente).



**Figura 10: Conteo de número de huevos de parásitos contados por gramo de heces (hpg) en corderos parasitados no tratados farmacológicamente pastoreando alfalfa o zulla (Nieven *et al.*, 1995). Donde hpg es el número de huevos de parásitos contados por gramo de heces en corderos**

Esta característica añade un nuevo valor a la especie, aportando más ventajas para su uso como planta cultivada de futuro, abriendo nuevas líneas de investigación que posibiliten un mayor aprovechamiento de sus cualidades. En este contexto el papel que desde la mejora genética se puede realizar es de gran importancia.

## 5. MEJORA GENÉTICA.

El objetivo y fin principal de la Mejora es obtener los mejores genotipos para un determinado medio y según el aprovechamiento para el que se van a destinar de acuerdo con las necesidades del hombre (Lacadena, 1970). El éxito en conseguir este objetivo está condicionado principalmente por dos factores: 1) la existencia de la suficiente variación genética y 2) ser capaces de manipularla para conseguir nuevos y estables cultivares (Sánchez-Monge, 1993). En este contexto, la labor del Mejorador consiste en modificar la estructura genética del material de partida siguiendo para ello los procesos o métodos adecuados (Cubero, 2003).

La variabilidad genética necesaria, la materia prima para la realización del proceso de mejora y permitir el progreso de la Agricultura (o Agriculturas) se encuentra en lo que la FAO en 1989 definió como Recursos Genéticos “material hereditario con valor económico, científico o social contenido en las especies”. Posteriormente, el Convenio Internacional sobre la Diversidad Biológica, presentado para

su firma en la Cumbre de Rio en junio de 1992, redefinió el término denominando los Recursos Genéticos a los materiales genéticos de valor real o potencial.

Esta amplia definición, en especies, se restringe por parte de los mejoradores en el término de Recursos Fitogenéticos, el cual comprende la diversidad genética correspondiente al mundo vegetal que se considera poseedora de un valor para el presente y para el futuro. Éstos están constituidos por variedades de especies cultivadas, tanto tradicionales como comerciales; especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas o con un valor actual o potencial, y materiales obtenidos en trabajos de mejora genética (Esquinas-Alcázar, 1993).

Por lo tanto, al considerar la necesidad de desarrollar mejores genotipos de *Hedysarum coronarium*, para fines y ambientes determinados, y para aprovechamientos específicos, a la hora de diseñar la Mejora Genética de la especie, se tendrá que tener en cuenta la existencia de la variabilidad genética suficiente. Será necesario disponer de los Recursos Fitogenéticos, es decir, de variedades cultivadas comerciales y tradicionales, de especies silvestres o asilvestradas, con materiales de mejora, y todo material que el mejorador considere de interés como materia prima para su trabajo.

Por otro lado, además de las materias primas, la mejora genética tiene sus propias metodologías y herramientas para la consecución de sus objetivos. Un aspecto muy importante, a la hora de elegir unos u otros métodos, es el modo de reproducción de la especie (en especies de reproducción sexual), ya que éste junto con las fuerzas de selección existentes determinará la estructura genética de las poblaciones que desarrollemos. En este sentido los mejoradores establecen dos grandes grupos, las especies predominantemente autógamas y las predominantemente alógamas siendo conscientes que los límites no son rígidos, pues el sistema reproductivo es el carácter adaptativo por excelencia (Cubero, 2003). La diferencia más importante entre estos dos grupos, entre sus poblaciones, es la debida a la influencia de la consanguinidad y la exogamia (Allard, 1967).

En las poblaciones de plantas (predominantemente) alógamas, la exogamia se ve favorecida por diversos mecanismos, alcanzando dichas poblaciones niveles de heterocigosis superiores a las de las plantas autógamas (Brown *et al.*, 1989). Por ello, a la hora de elegir un método de mejora para este tipo de plantas, una característica que se tendrá que conservar será la heterocigosis, por lo que se tendrán que buscar las mejores combinaciones entre las líneas que produzcan un efecto favorable de heterosis.

Al ser *H. coronarium* una especie descrita como predominantemente alógama, autocompatible y autofértil (Louati-Namouchi *et al.*, 2000) con polinización entomóloga (Ricciardelli D'Albore y

Quaranta, 1994; Satta *et al.*, 1999), los métodos de mejora tendrán que ser los propios para este tipo de plantas. En este sentido y como se indicaba en párrafos anteriores, será clave el conservar la heterosis, buscando las mejores combinaciones que produzcan este efecto favorable.

Los cruzamientos entre distintas líneas han sido utilizados tradicionalmente con el fin de combinar en una misma variedad caracteres de varios orígenes (caracteres que aporten algún interés).

Sin embargo, ninguna referencia ha sido encontrada sobre la realización de cruzamientos dirigidos o hibridaciones, y por lo tanto de su utilización en los distintos programas de mejora de la especie. En intentos realizados en nuestro equipo hasta la fecha tampoco se ha tenido éxito en la realización de cruzamientos entre un parental donante de polen y otro receptor.

Sí existen referencias, y resultados de obtención de materiales utilizando la metodología descrita de “Variedades Sintéticas” (Lloyd, 2006; Boller *et al.*, 2010). En este método se utiliza un número determinado de poblaciones que se “mezclan” en condiciones de polinización abierta en presencia de polinizadores con objeto de formar una nueva población que muestre un nivel de heterosis mayor que el inicial en las poblaciones respectivas, traduciéndose en un aumento de las características buscadas (producción, calidad, resistencia, tolerancia.. etc). De esta forma han sido desarrolladas variedades como: Grimaldi (Boller *et al.*, 2010), Moonbi y Wilpena (Lloyd, 2006)

El éxito en las líneas a desarrollar, además lógicamente de una buena selección de las líneas constitutivas, de los parentales, vendrá determinado por el lugar donde se realice la “multiplicación” y “selección” de la nueva población, ya que en cada ambiente las fuerzas de selección podrán actuar de una manera u otra.

El comportamiento de los genotipos en diferentes ambientes, su respuesta, es lo que se conoce como interacción genotipo ambiente (G x E); dicha interacción se acentúa cuando los ambientes de selección y destino son diferentes, siendo este el problema fundamental de la mejora genética de plantas (Fernandez *et al.*, 2003). Una de las formas de vencer las barreras de la interacción G x E, es seleccionar directamente en los ambientes de destino, lo cual permite que los nuevos cultivares se adapten mejor al ambiente biofísico (Cecarelli y Grando, 2000).

Abordados los materiales y los métodos será necesario establecer para qué carácter o caracteres mejorar. Tradicionalmente el aumento de la productividad ha sido el fin perseguido de la mejora de plantas, al que se le ha unido la obtención de resistencia a plagas y enfermedades o la mejora de características agronómicas. Se ha estimado que en los últimos 50 años, la mitad de los aumentos de cosecha en los cultivos más importantes para la humanidad son atribuibles a la introducción de nuevas

variedades obtenidas por mejora genética (Hayward *et al.*, 1993), frente a la situación anterior en que la mayoría de los aumentos de cosecha se atribuían a los fertilizantes, el riego y los tratamientos fitosanitarios.

En Australia, donde ha tenido un gran impulso la mejora de *H. coronarium*, los últimos trabajos están siendo dirigidos a la obtención de cultivares de semilla blanda que no necesitan descascarillado y por lo tanto contribuirían a reducir el coste de la semilla (Moore *et al.*, 2006).

En cuanto a las herramientas, el desarrollo que la Biotecnología ha tenido en los últimos 15-20 años ha permitido en líneas generales desarrollos más eficientes en los programas de mejora de plantas, integrando técnicas moleculares que ayudan en la difícil tarea de la selección.

Estas nuevas herramientas han permitido el descubrimiento de genes a gran escala y el análisis de su expresión a nivel global, lo cual brinda la posibilidad de identificar, caracterizar y utilizar genes de valor para la mejora vegetal.

Existen métodos de estudio de la función de los genes que se basan en ver las consecuencias que produce en un organismo la falta o el exceso de su actividad. Otros estudios abordan la obtención de información sobre la función de un gen intentando averiguar cuando y donde se expresan.

En este sentido, los análisis de expresión génica se consideran una valiosa herramienta para entender los procesos biológicos de las plantas, incrementando nuestro conocimiento de las señales y rutas metabólicas que subyacen a los procesos de desarrollo y celulares. Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación del gen hasta que la proteína se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular (Hernández *et al.*, 1995)

Los organismos regulan la expresión de sus genes de modo que en cualquier momento sólo se están expresando los genes que son necesarios. Los organismos superiores además regulan la expresión de sus genes de forma espacial, en cada tejido o tipo celular sólo se expresan los genes necesarios para la función de esos tipos celulares. De este modo, el estudio de las condiciones en las que se expresa un gen y el tipo celular en el que lo hace puede proporcionar gran cantidad de información sobre su función.

Estos estudios permiten identificar el gen o los genes claves en las rutas metabólicas y mediante la ingeniería genética, reorientar una o más reacciones de éstas, con el fin de producir compuestos nuevos en un organismo, mejorar la producción de los ya existentes, o mediar en la degradación de

éstos. Otras aplicaciones de este tipo de estudios es el detectar organismos genéticamente modificados (Demeke y Ratnayaka, 2008) o en tejidos enfermos determinar los genes que están implicados en el desarrollo y progreso de enfermedades (Luchi *et al.*, 2001)

## 6. REFERENCIAS

- Ahn, J., Elliott R., Norton, B., 1997. Oven drying improves the nutritional value of *Calliandra calothyrsus* and *Gliricidia sepium* as supplements for sheep given low-quality straw. *J. Sci. Food Agric.*, 75(4): 503-510.
- Allard, R.W., 1967. Principios de Mejora Vegetal. Ed. Omega S. A. Barcelona.
- Amato, G., Di Miceli, G., Giambalvo, D., Scarpello, C., Stringi, L., 2005. Condensed tannins content in sulla (*Hedysarum coronarium* L.) as affected by environment, genotype and growth stage. En: *Bioactive Compounds in Pasture Species for Phytotherapy and Animal Welfare*. (Ed.) Bullitta, S. Digital Space Publishing, Italy, pp 41–51.
- Amato, G., Giambalvo, D., Graciano, D., Ruisi, P., 2007. Forage and seed yield of sulla (*Hedysarum coronarium* L) varieties and landraces in a semi-arid Mediterranean environment. En: *Seed production in the northern light*. AAS: Bioforsk, pp, 68-72.
- Anastasi, U., Santonoceto, C., 2000. Phosphorus fertilization and seeding rate effects on sulla (*Hedysarum coronarium* L.) forage production. En: *Cahiers Options Méditerranéennes*. (Ed.) Sulas, L. Vol. 45, pp 141-145
- Anónimo, 1907. La Zulla la reina de las forrajeras de secano. Biblioteca Agraria Solariana. Sevilla.
- Anuraga, M., Duarsa, P., Hill, M.J., Lovett, J.V., 1993. Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. *Aust J Agric Res.*, 44: 1667-1681.
- Annichiarico, P., Abdelguerfi, A., Ben Younes, M., Bouzerzour, H., Carroni, A.M., 2008. Adaptation of sulla cultivars to contrasting Mediterranean environments. *Aust J Agric Res.*, 59: 702–706.
- Aoki, T., Akashi, T., Ayanabe, S., 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosíntesis, *J. Plant Res.*, 113: 475-488.
- Ball, D.M., Collins, M., Lacefield, G.D., Martin, N.P., Mertens, D.A., Olson, K.E., Putnam, D.H., Undersander, D.J., Wolf, M.W., 2001. *Understanding Forage Quality*. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL.
- Ballatore, G.P., 1963. El cultivo de la zulla. *L'Informatore Agraric.*, 52.
- Barry, T.N., Mc Nabb, W.C., 1999. The effect of Condensed Tannins in Temperate forages on Animal Nutrition and Productivity. En: *Tannins in Livestock and Human Nutrition*, (Ed.) Brooker, J.D. Canberra Australian Center for International Agricultural Research, pp 33-35.
- Basiner, T., 1845. Enumeratio monographica specierum generic *Hedysari*. *Bull. Cl. Phy.-Meth. Imp. Sci. Acad. St.-Petersb*, 4: 305-315.

- Boller, B., 2010. Handbook of plant breeding. En: Fodder crops and amenity grasses. (Eds) Boller, B., Posselt, U.K., Veronesi, F. pp 523.
- Borreani, G., Roggero, P.P., Sulas, L., Valente, M.E., 2003. Quantifying morphological stage to predict the nutritive value in sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Agronomy J.*, 95(6): 1608-1617.
- Boussaid, M., Ben Fadhel, N., Trifi-Farah, N., Abdelkefi, A., Marrakchi, M., 1995. Les espèces Méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. En : Ressources Génétiques des Plantes Fourragères et à Gazon. (Eds) Prosperi, J.M., Guy, P., Balfourier, F. BRG-INRA: Paris, pp 115-130.
- Braun, J., Fan, S., Meinzen-Dick, R., Rosegrant, M.W., Pratt, A. N., 2008. Investigación agrícola internacional para la seguridad alimentaria, la reducción de la pobreza y el medio ambiente. Resumen Temático 53 del IFPRI.
- Brown, A.H.D., Burdon, J.J., Jarosz, A.M., 1989. Isozyme analysis of plant mating system, En: Isozymes in Plant Biology (Eds) Soltis, D.E., Soltis, P.S. Discorides Press, Portland, USA, pp. 73-86.
- Bueno, M.A., 1979. Taxonometría y cariólogía en el género *Vicia*. Facultad de Ciencias (Biológicas). Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctorales I.N.I.A. nº 18.
- Bullitta, P., Sulas, L., Porqueddu, C., Caredda, S., 1996. Sistemi pascolivi della Sardegna. En: Attualità e prospettive della foraggicoltura da prato e da pascolo. Istituto Sperimentale per le Colture Foraggere di Lodi, Italy, pp 269-290.
- Burke, J.L., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., Brookes, I.M., 2004. The potential of sulla in pasture-based systems. *Anim. Prod. Aust.*, 25: 25-28.
- Bustamante, J., Allés, A., Espadas, M., Muñoz, J., 2000. El cultivo de la zulla en menorca (III): Zulla 1er año. Boletín de Información Técnica. Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Mahón (Menorca). Nº 20.
- Bustamante, J., Allés, A., Espadas, M., Muñoz, J., 2003. Valoración bromatológica de la zulla de 1er año. Boletín de Información Técnica. Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Mahón (Menorca). Nº 44.
- Bustamante, J., Allés, A., Espadas, M., Muñoz, J., 2005. Valoración bromatológica del ensilado de zulla. Boletín de Información Técnica. Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Mahón (Menorca). Nº 51.
- Cabrera, E., Ruiz-Argüeso, T., 1979. Diversidad de poblaciones nativas de rizobios de zulla (*Hedysarum coronarium* L.). VIII Congreso Nacional de Microbiología, Madrid, Spain, 28-30.
- Candolle, A.P., 1825. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. Treuttel et Würtz. Paris. 2: 1-644.
- Cecarelli, S., Grando, S., 2000. Fitomejoramiento participativo descentralizado. LEISA. Boletín de ILESA. Semillas para la agrodiversidad. 15(3-4): 35-36.
- Chand, R., 2008. The global food crisis: causes, severity and outlook. *Economic & Political Weekly*, 28: 115-123.
- Choi, B.H., Ohashi, H., 1996. Pollen morphology and taxonomy of *Hedysarum* and its related genera of the tribe *Hedysareae* (*Leguminosae-Papilionoideae*). *J. Jpn. Bot.*, 71: 191-213.

- Choi, B.H., Ohashi, H., 2003. Generic criteria and an infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (Papilionoideae-Leguminosae). *Taxon*, 52: 567-576.
- Chriki, A., Combes, D., Marrakechi, M., 1982. Héredité et analyse chromatographique de la pigmentation des fleurs chez l'espèce *Hedysarum coronarium* L. *Agronomie*, 2: 915-922.
- Córdoba, E.M, González-Verdejo, C.I., Die, J., Román, B., Nadal S., 2008. First Report of *Orobanche crenata* on Sulla (*Hedysarum coronarium*) in Andalusia, Southern Spain. *Plant Dis*, 92(12): 1709.
- Cubero, J.I., Moreno, M.I., 1979. Agronomic control and sources of resistance in *Vicia faba* to *Orobanche* sp. En: Some current research on *Vicia faba* in Wester Europe. (Ed.) Comisión de las Comunidades Europeas. pp 41-80.
- Cubero, J.I., Hernández, L. 1991. Breeding faba bean (*Vicia faba* L.) for resistanse to *Orobanche crenata* Forsk. *Options Méditerranéennes*, 10: 51-57.
- Cubero, J. I., 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Demeke, T., Ratnayaka, I., 2008. Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. *Food Control.*, 19: 893-897.
- De Koning, C., Yates, R., Wurst, M., 2008. Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) Managent Package. Produced by SARDI.
- Delgado, E.J., 1998. Factores anti nutricionales. Curso de Fisiología digestiva. ICA. La Habana, Cuba. p. 2.
- Douglas, G.B., Foote, A.G., 1985. Dry matter and seed yields of sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *New Zeal J Exp Agr.*, 13(1): 97-99.
- Douglas, G.B., Stienezen, M., Waghorn, G.C., Foote, A.G., Purchas, R.W., 1999. Effect of condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on body weight, carcass fat depth, and wool growth of lambs. *New Zeal J Exp Agr.*, 41(1): 55-64.
- Dzowella, B., Hove, L., Topps, J., 1995. Nutritional and anti-nutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen for some tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 55:207-214.
- Esquinas-Alcázar, J.T., 1993. La diversidad genética como material básico para el desarrollo agrícola. En: La Agricultura del siglo XXI. (Coord) Cubero, J.I., Moreno, M.T. Mundi Prensa, Madrid, pp. 79-102.
- Fedtschenko, B.A., 1902. The genus *Hedysarum*. *Acta Horti Petrop.*, 19: 185-342 .
- Fernández, L., Cristóbal, R., Ortiz, R., León, N., 2003. Fitomejoramiento participativo del maíz (*Zea mays* L.) una experiencia en La Habana. *Cultivos Tropicales*, 24( 4): 77-83.
- Flores, F., Gutierrez, J.C., Lopez, J., Moreno, M.T., Cubero J.I., 1997. Multivariate analysis approach to evaluate a germplasm collection of *Hedysarum coronarium* L. *Genet Resour Crop Evol.*, 44: 545-555.

- Galindo, J.C.G., de Luque, A.P., Jorrián, J., Macías, F.A., 2002. SAR studies of sesquiterpene lactones as *Orobancha cumana* seed germination stimulants. *J. Agric. Food Chem.*, 50(7): 1911-1917.
- García-Torres, L. 1993. *Biología y control de especies parásitas*. Editorial Agrícola Española, S.A. España.
- González de Tánago, A., Ratera, C., Ruiz, J.A., Ortiz, F., 1981. Notas sobre la zulla (*Hedysarum coronarium* L.) y Resultados de los ensayos realizados en esta especie. Agencia de Desarrollo Ganadero. Madrid. Boletín nº 12, 35.
- Gupta, R.K., Haslam, R.R., 1979. Vegetable tannins: structure and biosynthesis. En: *Polyphenols in cereals and legumes*. (Ed) Hulse, J.H. Inter Develop Res Centre, Box 8500, Canada. pp 15-24.
- Grenz, J.H., Manschadi, A.M., Uygur, F.N., Sauerborn, J., 2005. Effects of environment and sowing date on the competition between faba bean (*Vicia faba*) and the parasitic weed *Orobancha crenata*. *Field Crop Res.*, 93: 300-313.
- Hagerman, A., Robbins, C.H.T., Weerasuriya, Y., Wilson, T.C., McArthur, C., 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *J. Range Manage.*, 45 (1): 57-62.
- Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I., 1993. *Plant Breeding. Principles and Prospects*. Edit. Chapman y Mall, London.
- Hernández, A., Martín Vasallo, P., Torres, A., Salido, E., 1995. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*, 15(2): 67-84.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.*, 22: 253-261.
- INRA, 1978. *Alimentation des ruminants*. INRA Publishing, París, Francia.
- Issolah, R., Benhizia, H., Khalfallah, N., 2006. Karyotype variation within some natural populations of sulla (*Hedysarum coronarium* L., *Fabaceae*) in Algeria. *Gen. Res. Crop. Evol.*, 53(8): 1653-1664.
- Issolah, R., Knalfallah, N., 2007. Analysis of the morpho-physiological variation within some Algerian populations of sulla (*Hedysarum coronarium* L., *Fabaceae*). *J Biol Sci.*, 7: 1082-1091.
- Jacobsohn, R., Kelman, Y., 1980. Effectiveness of glyphosate in broomrape (*Orobancha* spp.) control in four crops. *Weed Sci.*, 28: 692-698.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, 120: 95-107.
- Jurado-Expósito, M., Castejón-Muñoz M., García-Torrés, L., 1999. Uptake and translocation of imazethapyr in peas as affected by parasitism of *Orobancha crenata* and herbicide application methods. *Weed Res.*, 39: 129.
- Karlovsky, J., Ratera, C., Ruíz, J.A., Ambel, E., 1971. Estudio de las necesidades nutritivas de las praderas espontáneas y mejoradas. Agencia de Desarrollo Ganadero. Ministerio de Agricultura. Madrid. Boletín nº 2.
- Kasrawi, M.A., B.E. Abu-Irmaileh., 1989. Resistance to branched broomrape (*Orobancha ramosa*) in tomato germplasm. *Hort. Sci.* 24(5): 822- 824.

- Krishnamurthy, S., Rao, U.M., 1976. Control of *Orobanche* through crop rotation. Indian Farming, 25: 23.
- Lacadena, J. R., 1970. Genética Vegetal. Fundamentos de su aplicación. A.G.E.S.A., Madrid.
- Le Houereou, H.N., 1969. Principes, methodes et Techniques d'ameloration pastolare et foirregere en Tunisie. FAO.
- Leto, G., Todaro, M., Di Noto, A.M., Alicata, M.L., 2002. Comparison of Sulla-hay and Sulla-silage in the lactating ewes and their effects on milk and cheese characteristics. Small Rumin Res., 45: 301-306.
- Liener, I.E., 1994. Implications of antinutritional components in soya bean foods. Critical Rev. Food Sci. Nutr. 34: 31-67.
- Liener, I.E., 1997. Plant lectins: Properties, nutritional significance, and function. Antinutrients and Phytochemicals in Food, 662: 31-43.
- Lloyd, D., 2006. Sulla - a new short-term perennial legume. Ground Cover Issue 62 - Pastures Supplement.
- Louati-Namouchi, I., Louati, M., Chriki, A., 2000. Mating system and multiple paternity in *Hedysarum coronarium* L (*Fabaceae*). Agronomie, 20: 655-663.
- Luchi, N., Capretti, P., Pinzani, P., Orlando, C., Pazzagli, M., 2005. Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak tissue. Letters in Appl Microbiol., 41: 61-68.
- Mauromicale, G., Restuccia, G., Marchese, M., 2001. Soil solarization, a non-chemical technique for controlling *Orobanche crenata* and improving yield of faba bean. Agronomie, 21(8): 757-765.
- Maymone, B., Tiberio, M., Maziotti Di Celso, P., 1951. Chemical composition and feed value of *Hedysarum coronarium* L. En: Conference for improvement of pasture and fodder product in the mediterranean area. Rome, 3-19.
- Midjavila, S., 1990. Sustancias nocivas en los alimentos. En: Toxicología de los alimentos. (Ed.) Derache, R. Omega. Barcelona, España. p. 109.
- Min, BR., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants feed fresh temperate forages: a review. Anim. Feed Sci. Technol., 106: 3-19.
- MARM, 2009. Anuario de Estadística. Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística. Madrid.
- Mir y Mir, P., 1906. Influencia del cultivo de la zulla en Menorca. Revista de Menorca, 65-78.
- Moore, G., Sanford, P., Wiley, T., 2006. Perennial pastures for Western Australia, Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.
- Molle, G., Decandia, M., Fois, N., Ligios, S., Cabiddu, A., Sitzia, M., 2003. The performance of Mediterranean dairy sheep given access to sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) pastures in different time proportions. Small Rumin. Res. 49: 319-328.
- Montes, T., 1994. La zulla. Nuevas áreas de cultivo, su problemática. Revista da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens. 14/15: 173-187.

- Moreno, V., Olea, L., 1984. Multiplicación de leguminosas anuales platenses *M. Polimorpha*, *T. Glomeratum*, *O. compressus*, y *H. coronarium*. Sociedade Portuguesa de Pastagens e forragens. VI Reuniao de Outono. Lisboa.
- Mottareale, G., 1898. Di alcuni organi particolari delle radici tuberculifere dello *Hedysarum coronarium* in relazione al *Bacillus radicola* e alla *Phytomyxa leguminosarum*. Atti R Ist Incoragg Napoli 11, 1-7.
- Muzquiz, M., Goyoaga, C., Pedrosa, M.M., Guillamón, E., Varela, A., Cuadrado, C., Burbano, C., 2006. Nutritionally active factors in faba bean. En: Internacional Workshop on Faba Bean Breeding and Agronomy. (Eds.) Avila, C.M., Cubero, J.I., Moreno, M.T., Suso, M.J., Torres, A.M. Junta de Andalucía. IFAPA. Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. pp 15-18.
- Nadal, S., Moreno, M.T., Cubero, J.I., Rubiales, D., 2005. Determinate faba bean young pod response to glyphosate and crenate broomrape (*Orobanche crenata*). J Sustain Agr, 25: 19-27.
- Nassib, A.M., Ibrahim, A.A., Saber, H.A., 1978. Brommrape (*Orobanche crenata*) resistance in broad beans. En: Proc. Seed Legumes. ICARDA Weekshop. Syria. pp 133-135.
- Nassib, M.A., Ibrahim, A.A., Khalil, S.A., 1982. Beeding for resistance to *Orobanche*. En: Faba Bean Improvement. (Eds.) Hawtin, H., C. Webb, C. Martinus Nijhoff Publishers. The Hague.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C., 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either Lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J Agr Sci., 125: 281-289.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, D., Waghorn, G.C., Green, R., 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and immunity to gastrointestinal nematode. Vet Parasitol, 105: 229-245.
- Norambuena, H., Díaz, J., Kroschel, J., Klein, O., Escobar, S., 2001. Rearing and field release of *Phytomyza orobanchia* on *Orobanche ramosa* in Chile. En: Proceedings 7th International Parasitic Weed Symposium. (Eds.) Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D.M., Musselman, L.J., Parker, C., Verkleij, J.A.C. Faculté des Ciencias, Université de Nantes, France. pp 258-261.
- Norton, B.W., 1993. The nutritive value of tree legumes. In Forage tree legumes in tropical agriculture. (Eds.) Gutteridge, R.C., Shelton, H.M. Wallingford, UK, CAB International pp. 177-191.
- Olives, G., 1967. La zulla. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- Ollero, F.J., Espuny, M.R., Bellogin, R.A., 1989. Mobilization of the symbiotic plasmid from a strain of *Rhizobium* sp (*Hedysarum coronarium* L.). Syst Appl Microbiol., 11(2): 217-222.
- Orgambide, G.G., PhilipHollingsworth, S., Tola, E., Cedergren, R.A., Squartini, A., Dazzo, F.B., Hollingsworth, R.I., Nuti, M.P., 1996. Glycoconjugate and lipid components of *Rhizobium* "hedysari" IS123, a root-nodule symbiont of the stress-tolerant legume *Hedysarum coronarium*. Can J Microbiol, 42(4): 340-345.
- Otero, M.J., Graciela, L., 2004. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales. Livest Res Rural Dev., 6(2).

- Parker, C., Riches, C.R. 1993. Parasitic weeds of the world: Biology and Control. CAB International. United Kingdom.
- Paterson, R.T., 1993. Use of trees by livestock. Antinutritive factors. NRI Chatham, United Kingdom, pp 2.
- Pérez, A., 2003. La enciclopedia. Salvat Editores S.A.
- Pérez-De-Luque, A., Sillero, J. C., Moral, A., Cubero, J. I., Rubiales, D., 2004. Effect of sowing date and host resistance on the establishment and development of *Orobanche crenata* in faba bean and common vetch. Weed Research, 44: 282-288.
- Preston, T.R., Leng, R.A., 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: Aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el Trópico. Condrít, Cali. p 312.
- Provenza, F.D., Villalba, J.J., Haskell, J., MacAdam, J.W., Grigggs, T.C., Wiedmeier, R.D., 2007. The value of plants physical and chemical diversity in time and space. Crop Sci. J. 47:382-398.
- Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 120: 179-201.
- Ratera, C., Muslera, E., Ruiz Cornejo, J.A., Ambel, E., 1976. Comunicación. Potencial y necesidades nutritivas de las praderas en varios suelos de Sureste español. ASPA: Boletín informativo de la Asociación de Productividad Agraria, 134: 90-97.
- Reganold, J.P., Jackson-Smith, D., Batie, S.S., Harwood, R.R., Kornegay, J.L., Bucks, D., Flora, C. B., Hanson, J.C., Jury, W.A., Meyer, D., Schumacher, A., Sehmsdorf, H., Shennan, C., Thrupp, L. A., Willis, P. 2011. Transforming U.S. agriculture. Science, 332: 670-671.
- Ricciardelli D'Albore, G., Quaranta, M., 1994. Gli insetti impollinatori della sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in Umbria. L'ape nostra amica, 5: 17-19.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Orive, R., 1991. Survival of *Rhizobium* sp. (*Hedysarum coronarium* L.) on peat-based inoculants and inoculated seeds. Soil Biol Biochem, 23: 375-379.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Bonilla, I., Ruiz, J.E., 2007. El cultivo de las leguminosas en España y la investigación en el área de los biofertilizantes. En: Biofertilizantes en Iberoamérica: Vision Técnica, Científica y Empresarial. Montevideo. Cyted. 1:52-60.
- Romano, E., 1951. La coltura della sulla ed il calcio de scambio nell terreno. Ann Sper. Agro, 5: 1533-1536.
- Romero, L.C.E., Palma, G.J.M., López, J., 2000. Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. Livest Res Rural Dev., 12 (4):1-9.
- Rubiales, D., Sillero, J.C., Cubero, J.I., 1999. Broomrape (*Orobanche crenata*) as a major constraint for pea cultivation in southern Spain. En: Resistance to *Orobanche*: the state of the art. (Ed.) Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. España. pp 83-88.

- Ruisi, P., Siragusa, M., Di Giorgio, G., Graziano, D., Amato, G., Carimi, F., Giambalvo, D., 2010. Pheno-morphological, agronomic and genetic diversity among natural populations os sulla (*Hedysarum coronarium* L.) collected in Sicily, Italy. *Genet Resour Crop Evol.*, 58(2): 245-257.
- Sánchez-Monge, E., 1993. Introduction. En: *Plant Breeding. Principles and Prospects.* (Eds.) Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I. Chapman & Hall. London. pp 3-5.
- San Miguel, A., 2011. *Pascicultura, cultivos agrarios y zootecnia.* Universidad Politécnica de Madrid.
- Samappito, S., Page, J., Schmidt, J., De-Eknamkul, W., Kutchan, T.M., 2002. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata*. *Planta*, 216(1): 64-71.
- Satta, A., Floris, I., Acciaro, M., 1999. Observations on the insects pollinating *Hedysarum coronarium* L. in Sardinia (Italy). *Insect Social Life*, 3: 161-166.
- Sauerborn, J., Saxena, M.C., Meyer, A., 1989. Broomrape control in faba bean (*Vicia faba* L.) with glyphosate and imazaquin. *Weed Res.*, 29: 97-102.
- Sierra Posada, J.O., 2005. Valoración de la calidad nutritiva de pastos y forrajes. En: *Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros.* 2ª edición. (Ed.) Universidad de Antioquia. pp 192-204.
- Shin, H.C., Hwang, H.J., Kang, K.J., Lee, B.H., 2006. An antioxidative and anti-inflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*. *Archive Pharm Res*, 29(2): 165-171.
- Springer, T.L., McGraw, R.L., Aiken, G.E., 2002. Variation of condensed tannins in roundhead lespedeza germplasm. *Crop Sci.*, 42: 2157-2160.
- Squartini, A., Struffi, P., Doping, H., Selenska-Pobel, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velásquez, E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Dazzo, F.B., Casella, S., Nuti, M.P., 2002. *Rhizobium sullae* sp nov (formerly 'Rhizobium hedysari'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52: 1267-1276.
- Stringi, L., Giambalvo, D., Amato, G., Accardo, A., 1997. Insilamento della sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in diversi stadi fenologici e a diversi tenori di sostanza secca mediante fasciatura delle rotoballe. *Rivista di Agronomia*, 31: 299-305.
- Sulas, L., Re, G.A., Caredda, S., Etienne, M., 1999. Hard seed breakdown pattern of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in relation to its regeneration capacity and persistence. En *proceedings of the FAO-CHIEM Inter-regional Co-op Research and Development Network`.* Cahiers Options Méditerranéennes, 39: 78-82.
- Sulas, L., Ledda, M., 2008. Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) seed production at different sowing rates. *Options Méditerranéennes, Series A*, 79: 483-486.
- Talamucci, P. 1998. The role of sulla in Italian forage crops. En: *La sulla: Possibili ruoli nella foreggicoltura mediterranea (In Italian).* (Eds.) Talamucci, P., Stagliano, N., Sabatini, S. Accademia dei Georgofili. Quaderni, 1998-I, Italian. pp 1-21.
- Taylor, G.B., Ewing, M.A., 1988. Effect of depth of burial on the longevity of hard seeds of subterranean clover and annual medics. *Aust J Exp Agr.*, 28: 77-81.

- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., Barry, T.N., 1992. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci, Cam.*, 119: 265-273.
- Thomas, H., Sauerborn, J., Muller-Stover, D., Kroschel, J., 1999. Fungi of *Orobanche aegyptiaca* in Nepal with potential as biological control agents. *Biocontrol Sci and Techn.*, 9(3): 379-381.
- Trifi-Farah, N., Baatout, H., Boussaïd, M., Combes, D., Figier, J., Hannachi-Salhi, A., Marrakchi, M., 2002. Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *Plant Genet Res Newslett* 130: 65–72.
- Vidal y Vives, D., 1890. Memoria sobre el cultivo de la zulla. Mahón. Imprenta de B. Fábregues.
- Waghorn, G.C., McNabb, W.C., 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 383-392.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in green ruminant production systems. *Trends Parasitol.*, 20: 493-497.
- Watson, M.J., 1982. *Hedysarum coronarium*, a new legume with potential for soil conservation and forage. *New Zeal Agr Sci.*, 16(4): 189-193.
- Wesly Colbert, R., 2009. Composición Botánica y Química de Asociaciones de Sorgo Forrajero y Leguminosas Anuales. Tesis Doctoral. Universidad de Puerto Rico.

## **O**BJETIVOS

---



Este trabajo de Tesis Doctoral se encuadra dentro de la línea prioritaria “Sostenibilidad y Eficiencia en Sistemas Agrarios” y en concreto en la actuación encaminada a la “Mejora genética y agronómica de la resistencia a enfermedades y a parásitos y de la calidad nutritiva de cultivos extensivos de secano” del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA).

Dicho trabajo pretende contribuir a la supervivencia económica, social y medioambiental de estos sistemas agrarios, aportando un mayor conocimiento en *Hedysarum coronarium* L. desde distintas aproximaciones.

En particular se quisieron abordar las siguientes cuestiones:

- Ampliación de la colección de trabajo de *H. coronarium* en el número de sus entradas, estudio de las características de interés agronómico de alta heredabilidad y su importancia para la toma de decisiones en la mejora genética de la especie.
- Estudio de la respuesta agronómica de *H. coronarium* en distintas condiciones de secano mediterráneas. Para ello se plantearon a su vez los objetivos concretos:
  - Identificar ecotipos de mayor respuesta en rendimiento de forraje y calidad en las condiciones ensayadas para el manejo tradicional.
  - Evaluar el comportamiento productivo del cultivo de *H. coronarium* sometido a diferentes regímenes de aprovechamiento (fecha de siega) en dos ambientes contrastantes
- Disponer de información en relación a la susceptibilidad de *H. coronarium* a *O. crenata*.
- Determinar la variabilidad de la concentración de taninos condensados en genotipos de *H. coronarium* que forman nuestra colección de trabajo.

- Establecer las bases moleculares para estudios de expresión génica en *H. coronarium*.
- Desarrollo de nuevos materiales vegetales de *H. coronarium*, estables y de mejores rendimientos de forraje, desarrollados específicamente para zonas productoras potenciales de Andalucía.

## CAPÍTULO I

---

Recursos fitogenéticos de *Hedysarum coronarium* L.



## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de los Recursos Fitogenéticos (RRFF) y su conservación para la mejora genética vegetal es manifiesta. La variabilidad es condición necesaria en la mejora de cualquier especie. La mejora no es magia, de donde no hay difícilmente se podrá obtener nada. Ni con los métodos más novedosos y potentes, el caso de la ingeniería genética, si no contamos con los materiales donadores de los genes de interés, no será posible obtener el resultado esperado en cada caso: una nueva variedad con una resistencia específica, un mayor contenido en un componente, mayores rendimientos etc. De ahí el interés de los mejoradores en disponer de los Recursos Fitogenéticos adecuados que permitan una rápida respuesta a los nuevos problemas que se presentan en los cultivos principales, así como explorar el desarrollo de nuevos cultivos que ayudarán a la mejora de la oferta (Nuez y Ruíz, 1999).

Uno de los primeros pasos en la mejora de una especie, es la constitución de una colección de trabajo (Gepts, 2000). Colección en la que el equipo de mejora busca reunir la mayor variabilidad para los caracteres objeto de su mejora, sirviéndose y aprovechándose de ella, de los genes que engloban, para su inclusión en el ideotipo de planta perseguida.

En nuestro caso, y previo a los trabajos de mejora propiamente dichos en *Hedysarum coronarium* L. se planteó la formación de una colección de trabajo y se solicitó en 2004 un proyecto a la convocatoria de la Acción Estratégica de RRFF del INIA (convocatoria 2004). Este proyecto (RF2004-00029-00-00) tenía como principales objetivos: la prospección y recolección de genotipos autóctonos de *H. coronarium*, su caracterización, conservación, documentación y envío al CRF de duplicados. Tras ser aprobado este proyecto, se comenzaron las actuaciones pertinentes para alcanzar los objetivos planteados, integrándose los trabajos de caracterización dentro de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral; así como otras actividades en materia de RRFF de *H. coronarium* contempladas en proyectos consecutivos (RF2009-00009-00-00).

En este capítulo se recogen los métodos y actuaciones para alcanzar el objetivo primero presentado en esta Tesis: “Ampliación de la colección de trabajo de *H. coronarium* en el número de sus entradas, estudio de las características de interés agronómico de alta heredabilidad y su importancia para la toma de decisiones en la mejora genética de la especie.”

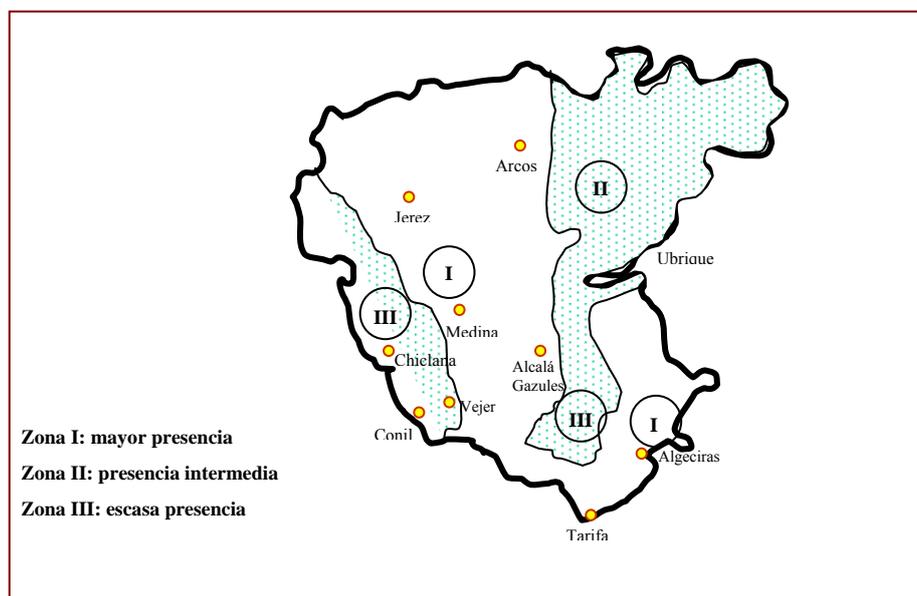
Este objetivo, para facilitar su consecución se desglosó en tres:

- Prospección y recolección
- Caracterización
- Análisis y estudio de la variabilidad para la toma de decisiones en la mejora genética de la especie

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Prospección y recolección.

Para abordar el diseño de la prospección de germoplasma en Andalucía, se comenzó con trabajos de gabinete y para el caso del material autóctono de la provincia de Cádiz se partió de los trabajos del Dr. Gutiérrez Mas (1982), quien en un ambicioso estudio clasificó en tres zonas la provincia de Cádiz, respecto a la presencia actual o potencial de *H. coronarium*. La zona I (donde se da con gran profusión), la II (donde podría existir) y la III (donde aparentemente faltan condiciones de suelo para su desarrollo). En la Figura 1 se muestran las tres zonas descritas por dicho autor.



**Figura 1: Distribución de *Hedysarum coronarium* en la provincia de Cádiz (Gutiérrez-Más, 1982)**

Muestras de 32 poblaciones naturales de *H. coronarium* en las zonas anteriormente descritas de Cádiz, fueron recolectadas en mayo durante los años 2004-2008, principalmente en bordes de carreteras, tierras agrícolas abandonadas y pastos naturales. En los años 2009 y 2010 se continuó con los trabajos de prospección y recolección de nuevas entradas extendiéndose a zonas de la provincia de Cádiz que anteriormente no habían sido prospectadas. La colecta de germoplasma se realizó considerando la época de fructificación de la especie.

A la hora de diseñar la estrategia para “colectar” germoplasma se fijó como criterio principal el recoger la máxima cantidad de variabilidad genética útil de la especie. Se tuvo que definir

tanto el número de plantas a coleccionar por sitio como el número de sitios a muestrear. En los casos en los que se tiene poca o ninguna información sobre la distribución de la variación en la naturaleza, cuestión clave para abordar los puntos anteriormente expuestos, se recomiendan recoger 50-100 individuos por sitio y tantos sitios como sean posibles (Marshall y Brown, 1975).

En nuestro trabajo se optó por coleccionar 50 individuos de cada población, cosechando la máxima cantidad de semilla por individuo, ya que al tratarse de una especie predominantemente alógama (Tyler *et al.*, 1987; Baatout *et al.*, 1991; Boussaïd *et al.*, 1995) es de esperar que la estructura de las poblaciones sea la propia de las especies con dicho modo de reproducción, mostrando un alto grado de heterocigosis. Las vainas de todos los individuos de cada población fueron mezcladas y después trilladas en el laboratorio. La mezcla de semillas se consideró representativa de la población natural muestreada.

En lo referente al número de “zonas” de muestreo, evitamos lugares muy cercanos por suponer contaminación por flujo génico (tanto desde polen como de plantas), estableciendo una distancia mínima de 10 km.

Las coordenadas de origen de las entradas (latitud y longitud) fueron georeferenciadas mediante un GPS.

En una primera expedición realizada el 5 y 6 de mayo del 2009, aprovechando la fecha de floración de la especie objeto del proyecto, se localizaron las poblaciones marcando su posición con ayuda del GPS. Cuando las vainas ya estaban perfectamente desarrolladas y sus granos fisiológicamente maduros, se realizó la segunda expedición el 10 de junio de ese mismo año, recolectando así las entradas pertenecientes a las poblaciones marcadas en la expedición anterior.

Una vez el material recolectado, se procedió al trillado de sus vainas (trilladora estacionaria Wintersteiger LD 350), y a la limpieza y acondicionamiento de las semillas para su almacenamiento en condiciones de baja temperatura en cámara fría.

## **2.2. Caracterización**

Otro de los objetivos de nuestro trabajo fue la caracterización preliminar del material recolectado. Para estimar esta variabilidad se utilizaron descriptores morfológicos. Estos se usan para clasificar los seres vivos mediante un sistema binario, con el fin de caracterizar y describir la variabilidad. Lo que se describe es el fenotipo y este depende del componente genético, ambiental y la interacción genotipo por ambiente. Los descriptores más usados son los que tienen herencia mendeliana o están controlados por pocos pares de genes, por lo tanto las variables serán de alta heredabilidad, fácilmente detectables por el ojo y se expresarán en todos los ambientes.

La caracterización de *H. coronarium* se llevó a cabo durante la campaña 2007-08, en la finca experimental del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro “Alameda del Obispo”. En la Tabla 1 se presentan las entradas caracterizadas con los datos de pasaporte disponibles.

**Tabla 1. Poblaciones de zulla (*Hedysarum coronarium L.*) recolectadas durante los años 2004-2008.**

Población	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Ubicación	Año de recolección
1	N 37°23'55,5''	W 05°35'33,1''	80	Finca Tomejil (Carmona)	2004/05
3	N 36°58'29,7''	W 05°51'37,1''	69	Villamartín-Cádiz (Cruce de las Cabezas)	2004/05
4	N 36°52'43,8''	W 05°48'08,9''	47	A393 km 14. Espera-Arcos	2004/05
5	N 36°48'42,1''	W 05°48'54,9''	107	Paterna-Medina Sidónea	2004/05
6	N 36°28'30,1''	W 05°55'11,8''	118	Paterna-Medina Sidónea	2004/05
7	N 36°26'55,6''	W 05°55'13,9''	170	Salida Medina Sidónea hacia Barbate	2004/05
8	N 36°16'14,6''	W 05°56'15,1''	5	Medina Sidónea-Vejer	2004/05
9	N 36°39'39,7''	W 06°21'32,7''	32	A491 km 11	2004/05
10	N 36°36'53,3''	W 06°15'59,6''	30	A491. Base de Rota-Puerto Sta. María	2004/05
12	N 36°27'22''	W 05°57'42,5''	70	Cañada Real	2004/05
13	N 36°27'53,7	W 05°53'58,6''	128	A381 Medina Sidónea-Jerez	2004/05
14	N 36°36'8,9''	W 06°02'56,7''	65	A381 km 7	2004/05
15	N 36°41'23,8''	W 06°09'15,6''	7	Variante Jerez, frente Hospital.	2004/05
16	N 36°43'46,3''	W 06°09'06,6''	24	Rancho de la Merced, Canal de las ochenta	2006/07
17	N 36°12'40,2''	W 05°32'37,9''	26	Carretera dirección los Barrios	2006/07
18	N 36°11'37,5''	W 05°32'53,6''	51	Camino forestal dirección a Fascina.	2006/07
23	N 36°05'42,0''	W 05°46'22,5''	39	Por lo alto de las ruinas romanas-Bolonia	2006/07
24	N 36°08'57,5''	W 05°49'56''	0	Cuneta dirección Zarzuela-Zahara.	2006/07
25	N 36°08'49''	W 05°51'27,3''	18	Población costa zona militar	2006/07
27	N 36°38'22,8''	W 05°26'45,6''	357	A-373, margen izquierdo.	2006/07
29	N 36°32'04,0''	W 05°35'10,7''	497	Ca-3331, margen izquierdo.	2006/07
30	N 36°22'38''	W 05°39'06,2''	35	Vía de servicio Los Barrios-Jerez.	2007/08
31	N 36°27'00,1''	W 05°44'53,7''	63	Vía de servicio Parque Alcalá de los Gazules	2007/08
32	N 36°29'06,5''	W 05°45'52,9''	101	Alcalá de los Gazules-San José del Valle.	2007/08
33	N 36°51'15,2''	W 06°10'00,1''	15	Carretera llegando a Trebujena.	2007/08
34	N 36° 71'83''	W 06°15'37''	24	Rancho de la Merced	2007/08

A la hora de elegir los “descriptores” a utilizar, al no existir catálogo de éstos propuesto por el IPGRI para la especie en cuestión, se utilizaron aquellos de los existentes para leguminosas forrajeras en sentido amplio, que mejor se adaptaban a nuestra especie. Al margen de dichos descriptores “adoptados”, existe en la bibliografía información relativa a los caracteres que mayor proporción de la variabilidad han explicado cuando se han estudiado colecciones de germoplasma de *H. coronarium* (Monotti y Porceddu, 1976; Figier *et al.*, 1978; Flores *et al.*, 1997; Ruisi *et al.*, 2010), siendo la fecha de floración, el número de tallos por planta y la longitud del tallo principal los que mayor efecto discriminante tuvieron entre los ecotipos estudiados.

Semillas de 26 poblaciones naturales de Cádiz y 3 variedades comerciales (Carmen, Grimaldi y Del País) fueron sembradas en “jiffy pots” (4x5 cm) el 10 de enero del 2008 usando 15 semillas escarificadas de cada entrada. Después de 10 semanas, 5 plantas seleccionadas al azar de cada entrada fueron trasplantadas al campo en jaulas de aislamiento sin polinizadores y el diseño experimental utilizado fue un diseño de clasificación simple. Los caracteres fenológicos y morfológicos que se registraron durante el primer ciclo del cultivo fueron: inicio fecha de la floración (IF) y fin fecha de la floración (FF) (medidos como número de días, ambos datos se tomaron desde su trasplante al campo), altura de la planta en cm (A), longitud del tallo principal en cm (LTP), número de entrenudos del tallo principal (E), área foliar de un foliolo ubicado en la mitad de la hoja, situada en el centro del tallo principal, medido en cm<sup>2</sup> (longitud por anchura del foliolo) (AF), número de foliolos de la hoja situada en el centro del tallo principal (F), grosor del tallo principal en cm (GTP) y número de inflorescencias (I). Los caracteres A, LTP, E, AF, F, GTP y I fueron medidos al inicio de la floración. Un descriptor cualitativo fue el medido como frecuencia de plantas con un determinado hábito de crecimiento (roseta, postrado o erecto/erguido).

### **2.3. Análisis y estudio de la variabilidad**

El diseño experimental de clasificación simple que utilizamos trata de comparar varios grupos y para hacer esta comparación se usa una variable de respuesta cuantitativa “Y” que es medida en cada uno de los grupos. Los datos deben ser recolectados de la siguiente manera:

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>....</b>	<b>Grupo K</b>
Y <sub>11</sub>	Y <sub>21</sub>	Y <sub>31</sub>	....	Y <sub>k1</sub>
Y <sub>12</sub>	Y <sub>22</sub>	Y <sub>32</sub>	....	Y <sub>k2</sub>
Y <sub>13</sub>	Y <sub>23</sub>	Y <sub>33</sub>	....	Y <sub>k3</sub>
			....	
Y <sub>1n1</sub>	Y <sub>2n2</sub>	Y <sub>3n3</sub>	....	Y <sub>knk</sub>

Donde el grupo 1 tiene n<sub>1</sub> observaciones, el grupo 2 tiene n<sub>2</sub> observaciones y así sucesivamente.

La comparación de los grupos se reduce a determinar si hay igualdad de medias poblacionales de la variable respuesta en todos los grupos. Es decir:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k \text{ versus}$$

$$H_a = \text{Al menos un grupo tiene distinta media poblacional}$$

### 2.3.1. Estadística descriptiva.

Se han obtenido los valores medios con sus errores estándar para los caracteres objeto de estudio y para el total de las entradas estudiadas.

### 2.3.2. Análisis de la varianza

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para cada una de las características incluidas en este estudio. Para la comparación múltiple de medias se utilizó el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

### 2.3.3. Correlación lineal

Con el fin de conocer las relaciones entre los caracteres estudiados, hemos utilizado el coeficiente de correlación de Pearson (r):

$$r = (\sum xy) / \sqrt{(\sum x^2)(\sum y^2)}$$

Hay que tener presente que la correlación entre dos variables pueden deberse a su relación común con otras variables (Snedecor y Cochran, 1982).

#### 2.3.4. Análisis de componentes principales.

El origen de las componentes principales está en la publicación de un artículo de K. Pearson en 1901, aunque algunos autores lo asocian a los primeros desarrollos de la ley normal n-dimensional realizados por Bravais y Skols en la segunda mitad del siglo XIX.

La técnica del análisis de componentes principales puede considerarse desde diversas perspectivas, según en que sentido ponga su énfasis el investigador. En primer lugar, puede considerarse como una técnica con finalidad descriptiva que permite tratar matrices de grandes dimensiones. Podemos entenderla también como una técnica exploratoria, en sentido que, explorar los datos, sin imponer restricción alguna sobre ellos, será el primer paso para entenderlos (Batista y Martínez, 1989)

Su finalidad es la de simplificar la estructura de los datos sin obedecer a un modelo fijado *a priori*, para poder explicar en pocas componentes la mayor parte de la información que contienen las variables (Cuadras, 1981). Estas nuevas variables se determinarán mediante combinación lineal de las variables originales. Las nuevas variables obtenidas se denominarán componentes y no estarán correlacionadas entre sí. La varianza de cada componente recibe el nombre de autovalor o valor propio. El sumatorio de las varianzas de las componentes principales o autovectores coincide con la varianza total de la matriz de datos original. De aquí se desprende el hecho de que la variabilidad contenida en la matriz es idéntica a la matriz de las observaciones,  $x$ , sin embargo el valor de la varianza de la primera componente es mayor que la de la segunda y así consecutivamente, la segunda con la tercera, la tercera con la cuarta,..... De aquí que con las dos o tres primeras componentes se consiga un valor acumulado que puede constituir hasta el 90 o 95 % de la varianza total de partida (Reyes, 1994), pudiendo ser usadas para representar a los datos originales (Everitt, 1978).

Partimos de  $p$  componentes observables en  $n$  individuos. Consideramos a los individuos como puntos en un espacio de  $p$  dimensiones y le ajustamos por el método de mínimos cuadrados la recta:

$$\frac{x_1 - m_1}{l_1} = \frac{x_2 - m_2}{l_2} = \dots = \frac{x_p - m_p}{l_p}$$

Se puede hacer que la recta pase por el origen y  $m_i = 0$  ( $i=1-p$ ); por ser 1 cosenos directores:

$$\sum_{i=1}^p l_i^2 = 1$$

El término general de la matriz de datos es  $x_{ij}$  ( $i = 1 \longrightarrow p$ ;  $j = 1 \longrightarrow n$ ); tipificando y multiplicando la matriz de datos tipificados por su traspuesta obtiene la matriz de coeficientes de correlación (multiplicada por  $1/n$ ).

Se demuestra que los valores  $\lambda_i$  que hacen mínimas las distancias de los puntos  $x_{ij}$  a la recta de regresión se pueden obtener de las ecuaciones:

$$R = \begin{vmatrix} 1 & r_{12} & r_{1p} \\ r_{21} & 1 & r_{2p} \\ r_{p1} & r_{p2} & 1 \end{vmatrix}$$

$$\begin{aligned} \lambda_1(1 - \lambda) + \lambda_2(r_{12}) + \dots + \lambda_p(r_{1p}) &= 0 \\ \lambda_2(r_{21}) + \lambda_2(1 - \lambda) + \dots + \lambda_p(r_{2p}) &= 0 \end{aligned}$$

$$\lambda_1(r_{p1}) + \lambda_2(r_{p2}) + \dots + \lambda_p(1 - \lambda) = 0$$

o de otra forma:

$$|R - \lambda I| = 0$$

siendo  $\lambda$  un multiplicador indeterminado del que podemos obtener  $p$  valores. Se demuestra asimismo que nunca puede ser negativo y que  $\sum \lambda_i = p$ . Como cada valor de  $\lambda$  lleva asociado un vector propio, y estos vectores son ortogonales entre sí, hemos obtenido unas nuevas variables en función de las antiguas:

$$Z_i = \sum_{j=1}^p l_{ij} x_j$$

Demostrándose que  $\text{var } Z_i = \lambda_i$

Definidos los individuos en los nuevos ejes se halla la correlación entre los valores peso y las coordenadas en cada nuevo eje sucesivamente. En los nuevos ejes más correlacionados con peso, se observarán las variables originales que más influyan. Las nuevas variables tendrán las siguientes características:

- 1) son combinaciones lineales de las variables iniciales

- 2) la media de las componentes es nula
- 3) la varianza de las componentes es igual al valor propio asociado a cada componente
- 4) las componentes principales son variables no correlacionadas dos a dos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Prospección y recolección.

Como resultado de este punto, fueron recolectadas 14 nuevas entradas de *H. coronarium*. Este material, tras su desgrane, limpieza y preparación fue conservado en condiciones de baja temperatura (8 °C) en cámara fría (cámara de RRFF del IFAPA Centro “Alameda del Obispo” de Córdoba).

Los datos de pasaporte de las entradas se recogen en la Tabla 2 y su origen geográfico se ha reflejado en la Figura 2.

**Tabla 2. Coordenadas y datos de pasaporte de las nuevas poblaciones de zulla colectadas en el 2009/10.**

Población	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Ubicación	Año de recolección
38	N 36°47'922''	W05°34'020''	330	Ca-523A, Km 9. Prado del Rey	2009/10
39	N 36°45'086''	W05°30'546''	285	A 373 Km 18. Ubrique-El Bosque. El Bosque	2009/10
40	N 36°39'758''	W05°26'959''	320	A 373 Km 32-39. Ubrique-Alcalá de Los Gazules. Ubrique	2009/10
41	N 36°37'202''	W05°27'225''	590	A 373. Ubrique-Cortes. Puerto “Mojón de La Vívora”. Ubrique	2009/10
42	N 36°37'327''	W05°23'698''	705	A 373 Km 46. Ubrique-Cortes. Cortes de la Frontera	2009/10
43	N 36°36'912''	W05°20'041''	510	A 373 Km 57. Cortes-Algeciras. Cortes de la Frontera	2009/10
44	N 36°28'158''	W05°24'439''	60	A 405 Km 14-19. San Pablo de Buceite-Jimena. San Pablo de Buceite	2009/10
45	N 36°13'848''	W05°24'255''	60	Ca 9203 Km 3-4. Castellar-San Roque. San Roque	2009/10
46	N 36°11'430''	W05°25'873''	15	N 340 Los Barrios. Palmones	2009/10
47	N 36°03'252''	W05°33'150''	320	N 340 Km 89. Algeciras-Tarifa. Tarifa	2009/10
48	N 36°17'008''	W05°57'637''	60	A 396 Km 28. Vejer-Medina Sidonia. Vejer de la Frontera	2009/10
49	N 36°24'456''	W05°44'799''	85	A 2228 Km 26-30. Benalup-Alcalá de los Gazules. Alcalá de los Gazules	2009/10
50	N 36°26'457''	W05°43'236''	65	A 381. Alcalá de los Gazules-Arcos de la Frontera. Alcalá de los Gazules	2009/10
51	N 36°29'949''	W05°46'159''	80	Ca 5200 Km 1. Alcalá de los Gazules	2009/10



**Figura 2:** Mapa de distribución de las 14 nuevas poblaciones de *Hedysarum coronarium L.* colectadas durante los años 2009-2010

### 3.2. Caracterización del material

En la Tabla 3 se muestran los valores medios y los errores estándar obtenidos para los siete descriptores morfológicos estudiados y para el inicio y fin de floración de cada una de nuestras entradas. También se exponen los valores medios de cada parámetro estudiado junto con el coeficiente de variación, obtenidos del análisis de la varianza, para el total de las entradas. Dichos análisis caracterizan los materiales, utilizando como descriptores los caracteres estudiados mostrando los intervalos de los valores en los que se encuentran. Diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones han resultado para todas las variables analizadas. Los valores medios de cada descriptor, mostraron coeficientes de variación que iban desde 3,8 % hasta 35,21 %. Las variables que presentaron menor coeficiente de variación fueron inicio, fin de floración y número de foliolos con un 13,1 %, 3,8 % y 13,62 % respectivamente, siendo el área foliar (35,21 %) la que presentó el valor más alto.

**Tabla 3. Valores medios±es y coeficiente de variación para inicio, fin de floración (días), altura (cm), longitud del tallo principal (cm), número de entrenudos, área foliar (cm<sup>2</sup>), número de foliolos, grosor del tallo principal (cm) e inflorescencias de las entradas de la colección de trabajo de *Hedysarum coronarium* L.**

Población	Inicio Floración	Fin Floración	Altura	Longitud Tallo Principal	Número Entrenudos	Área foliar	Número Foliolos	Grosor Tallo Principal	Número Inflorescencias
<i>Hc-1</i>	78,2±1,7ab	122±0a	52±6,5ab	89,2±5,6ab	16,2±0,6a	6,7±0,9abc	9,7±0,2abcd	2,4±0,1ab	46,2±3,3ab
<i>Hc-3</i>	53,5±1,4cde	108±0 ab	32,7±2,6bcdefg	43,2±5,3b	6±0e	5±0,9abc	8±0,4bcd	1,7±0,1abc	25,2±2,5abc
<i>Hc-4</i>	61,2±5,2 abcde	108±0b	22,5±1,5defg	41,5±3,8b	6,7±0,4de	3,2±0,4c	8,2±1bcd	1,6±0,1bc	15,7±6,7c
<i>Hc-5</i>	61,2±5,2 abcde	116,2±3,4 ab	29,7±2cdefg	56,7±8,4ab	7,5±0,5cde	5,3±1abc	8,2±0,6bcd	2±0,2abc	23,7±2,3abc
<i>Hc-6</i>	72,5±2,5abcd	122±0a	28,2±4,2cdefg	63,7±4,8ab	9±0,4bcde	4,7±1,1abc	9,5±0,5abcd	1,8±0,1abc	25,7±2,1abc
<i>Hc-7</i>	66,7±9,4 abcde	144±2,9 ab	24±4defg	64,2±16,5ab	9,2±2bcde	5,1±1,1abc	8,2±0,6bcd	1,7±0,1abc	17,5±4,6bc
<i>Hc-8</i>	69,7±4,2abcde	122±0a	31,5±4cdefg	79,5±4,7ab	10,5±0,6abcde	4,4±0,5abc	8,5±0,5abcd	2±0,1abc	38,7±6,5abc
<i>Hc-9</i>	66,5±3,5 abcde	188,5±3,5 ab	21±0,7efg	45,2±7,7b	7,5±0,8cde	3,2±0,4c	7,7±0,2cd	1,5±0c	29,6±4,3abc
<i>Hc-10</i>	54,7±4,2bcde	122±0a	23±6,1defg	43,7±2,3b	6,7±0,4de	4,4±0,9abc	8,7±0,4abcd	1,9±0,1abc	22,5±1,5abc
<i>Hc-12</i>	46±2,3e	115±4ab	14,2±1,4g	42,7±2,6b	5,7±0,7e	3,2±0,6c	8,5±0,5abcd	1,7±0,1abc	30,2±3,6abc
<i>Hc-13</i>	70±0abcde	119,7±2,2ab	26±2,9defg	77±9,9ab	9±0,8bcde	5,5±0,7abc	8,5±0,5abcd	2±0,1abc	32,5±2,3abc
<i>Hc-14</i>	63,7±6,9 abcde	116,2±3,4 ab	28,5±4,3cdefg	76,5±19,9ab	9,5±2,3bcde	4±0,9bc	9,2±0,4abcd	1,9±0,1abc	34,6±5,8abc
<i>Hc-15</i>	66,2±5,4 abcde	117,5±2,5 ab	21,2±2,1defg	56±7,3ab	8,5±1,1bcde	3,5±0,4c	9,5±0,5abcd	1,7±0abc	35,5±3,3abc
<i>Hc-16</i>	65±7,2 abcde	115±4 ab	29,7±3cdefg	76,7±10,1ab	10±1,7abcde	4,2±0,5abc	9,2±0,7abcd	2±0,2abc	33,3±10,2abc
<i>Hc-17</i>	72,5±2,5abcd	112,7±3,3 ab	27,2±2,2defg	56,2±7ab	9,7±0,7abcde	4,8±0,7abc	7,2±0,4d	1,7±0,1abc	36,7±8,7abc
<i>Hc-18</i>	61,2±5,2 abcde	122±0a	17,5±1,8fg	48,2±8,4b	7,7±0,9bcde	3±0,6c	7,7±0,2cd	1,6±0,1bc	28±4,8abc
<i>Hc-23</i>	69±4,9 abcde	119,7±2,2 ab	24,5±2,7defg	63,5±9,3ab	9,2±0,7bcde	3±0,4c	8,5±0,9abcd	1,7±0,1abc	29±3,6abc
<i>Hc-24</i>	79,7±5,1a	108±0b	34,7±2abcdef	67,2±5,4ab	10,5±1abcde	7,5±1,6abc	9±1,2abcd	2,1±0,2abc	25±8abc
<i>Hc-25</i>	76,7±4,1abc	114±2,9 ab	35±7,4abcdef	84,5±10,9ab	13±1,5abcd	5,4±0,5abc	10,7±0,4abc	2,5±0,1a	43±11,8abc
<i>Hc-27</i>	67±5 abcde	110,5±1,4 ab	25±3,3defg	39,7±5b	6,2±1,3e	4,5±0,7abc	7,7±0,6cd	1,6±0,1bc	18,6±1,4abc
<i>Hc-29</i>	65,6±2,6 abcde	113,8±2,2 ab	18,8±1,2fg	63,2±11,4ab	9,6±1,2bcde	3,5±0,5c	10,2±0,6abcd	1,8±0abc	34,7±7abc
<i>Hc-30</i>	67,7±6 abcde	108±0b	40,5±3abcd	41,5±5,9b	9,5±0,6bcde	4,9±0,3abc	9±0,5abcd	1,9±0,1abc	23,5±8,5abc
<i>Hc-31</i>	59,5±3,5 abcde	112,7±3,3 ab	24,5±2,4defg	73,2±10,4ab	9±0,7bcde	3,7±0,3bc	8,7±0,7abcd	1,8±0,1abc	31,7±5abc
<i>Hc-32</i>	52±2,3de	111,5±3,5 ab	17,2±2,1fg	40,2±3,1b	7±1de	3,5±0,4c	8,7±0,7abcd	1,8±0,1abc	11,3±1,8c
<i>Hc-33</i>	63,7±3,6 abcde	113±0 ab	24,2±2,1defg	66±8,3ab	8,5±0,2bcde	5±0,7abc	9,7±0,2abcd	1,9±0,1abc	24,6±12,6abc
<i>Hc-34</i>	74,7±4,1abcd	122±0a	35±2,6abcdef	68,7±9,7ab	11,5±1abcde	7,3±1,1abc	10,5±0,2abcd	2,3±0,1abc	35,5±2,8abc
<i>Carmen cv.</i>	78,2±2,8ab	122±0a	52,7±0,8a	100,7±14,5a	14,2±2,1ab	8,9±1,6a	11,7±0,8a	2,5±0,3a	42±6,1abc
<i>Grimaldi cv.</i>	77,5±2,5abc	122±0a	39,7±5abcde	76,5±8,5ab	11,7±1,3abcde	6,4±0,1abc	10,5±0,5abcd	2,3±0,1abc	47±1ab
<i>Del Paí cv.</i>	78,2±2,8ab	122±0a	47,2±2,9abc	99,2±7,5 <sup>a</sup>	14±1,3abc	6,3±1,1abc	9,7±0,6abcd	2,4±0,2ab	48,5±4,4a
<b>Media±es</b>	<b>67,2±1</b>	<b>116,5±0,5</b>	<b>29,7±1</b>	<b>63,9±2,1</b>	<b>9,5±0,2</b>	<b>4,9±0,2</b>	<b>9,1±0,1</b>	<b>1,9±0</b>	<b>31,2±1,2</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>13,1</b>	<b>3,8</b>	<b>23,67</b>	<b>28,82</b>	<b>57</b>	<b>25,28</b>	<b>35,21</b>	<b>13,62</b>	<b>15,76</b>

### **3.3. Relaciones entre los caracteres estudiados.**

La Tabla 4 presenta el coeficiente de correlación para cada par de variables estudiadas. Un coeficiente de correlación  $r$  es un número entre  $-1$  y  $+1$ , que mide la fuerza de la relación lineal entre dos variables. Cuanto más cercana sea la correlación a  $-1$  ó  $+1$ , más fuerte será la relación. Para determinar si dos variables estaban o no relacionadas entre sí, se calculó P-valor para cada coeficiente de correlación, el cual prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. P-valores por debajo de 0,05 indica correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95 %.

Se destacan las relaciones entre caracteres siguientes:

1. Se observa una alta correlación positiva entre número de entrenudos del tallo principal y longitud del tallo principal con un valor de 0,87, seguido de grosor del tallo principal y altura con valores de 0,85 y 0,83 respectivamente.
2. Correlación también positiva entre área foliar y altura con un valor de 0,82, seguido de grosor del tallo principal (0,79); plantas con mayor altura y un tallo principal más grueso presentaran una mayor área foliar.
3. La altura de la planta presenta una correlación alta con número de entrenudos y área foliar, con valores muy similares de 0,83 y 0,82 respectivamente.
4. Correlación entre número de foliolos y grosor del tallo principal; a mayor grosor del tallo principal las hojas estarán compuestas por un mayor número de foliolos.
5. El grosor del tallo principal tuvo una alta correlación con el número de entrenudos del tallo principal con un valor de 0,8565 y con longitud del tallo principal.
6. Correlación positiva entre inicio de floración y número de entrenudos, seguido de la altura y de la longitud del tallo principal, con valores de 0,82, 0,71 y 0,69 respectivamente.
7. El número de inflorescencias resultó correlacionado con el número de entrenudos (0,78) y con la longitud del tallo principal (0,77); a mayor longitud del tallo principal la planta tendrá un mayor número de inflorescencias y número de entrenudos.

Con respecto al descriptor fin de floración no se encontraron correlaciones “altas” como en los demás caracteres estudiados.

**Tabla 4. Análisis de correlaciones de los caracteres estudiados.**

	<b>E</b>	<b>AF</b>	<b>A</b>	<b>FF</b>	<b>F</b>	<b>GTP</b>	<b>IF</b>	<b>I</b>	<b>LTP</b>
<b>E</b>									
<b>P-valor</b>									
<b>AF</b>	0,6902								
<b>P-valor</b>	0,0000								
<b>A</b>	<b>0,8319</b>	<b>0,8281</b>							
<b>P-valor</b>	0,0000	0,0000							
<b>FF</b>	0,4409	0,2185	0,2612						
<b>P-valor</b>	0,0167	0,2547	0,1711						
<b>F</b>	0,6882	0,5909	0,5701	0,3391					
<b>P-valor</b>	0,0000	0,0007	0,0012	0,0720					
<b>GTP</b>	<b>0,8565</b>	<b>0,7986</b>	0,8088	0,3612	<b>0,7938</b>				
<b>P-valor</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0542	0,0000				
<b>IF</b>	<b>0,8218</b>	0,6835	<b>0,7135</b>	0,3341	0,4982	0,6375			
<b>P-valor</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0765	0,0060	0,0002			
<b>I</b>	<b>0,7825</b>	0,4325	0,6063	0,5665	0,5594	0,6848	0,6077		
<b>P-valor</b>	0,0000	0,0191	0,0005	0,0014	0,0016	0,0000	0,0005		
<b>LTP</b>	<b>0,8741</b>	0,6179	0,6903	0,4982	0,6657	<b>0,8161</b>	0,6967	<b>0,7798</b>	
<b>P-valor</b>	0,0000	0,0004	0,0000	0,0060	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	

**Nota:** número de entrenudos (E), área foliar (AF), altura (A), fin de floración (FF), número de foliolos (F), grosor del tallo principal (GTP), inicio de floración (IF), número de inflorescencias (I) y longitud del tallo principal (LTP). P-valores debajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de 0, con un nivel de confianza del 95 %

El carácter morfológico cualitativo estudiado es el que se muestra en la Tabla 5. Los resultados mostraban que casi la mitad de las entradas presentaban un hábito de crecimiento postrado, seguido de roseta y el 20 % correspondía a un porte erguido.

**Tabla 5. Frecuencia del tipo de porte (%) que presentan las distintas poblaciones de zulla**

Población	Hábito de crecimiento		
	Roseta	Postrado	Erecto /Erguido
<i>Hc-1</i>	0	40	60
<i>Hc-3</i>	20	60	20
<i>Hc-4</i>	60	20	20
<i>Hc-5</i>	20	60	20
<i>Hc-6</i>	20	80	0
<i>Hc-7</i>	80	20	0
<i>Hc-8</i>	40	40	20
<i>Hc-9</i>	20	20	60
<i>Hc-10</i>	40	60	0
<i>Hc-12</i>	100	0	0
<i>Hc-13</i>	0	100	0
<i>Hc-14</i>	0	100	0
<i>Hc-15</i>	100	0	0
<i>Hc-16</i>	20	60	20
<i>Hc-17</i>	40	40	20
<i>Hc-18</i>	80	20	0
<i>Hc-23</i>	80	0	20
<i>Hc-24</i>	0	80	20
<i>Hc-25</i>	0	100	0
<i>Hc-27</i>	0	100	0
<i>Hc-29</i>	100	0	0
<i>Hc-30</i>	0	20	80
<i>Hc-31</i>	80	20	0
<i>Hc-32</i>	100	0	0
<i>Hc-33</i>	20	80	0
<i>Hc-34</i>	0	40	60
<i>Carmen cv.</i>	0	0	100
<i>Grimaldi cv.</i>	0	80	20
<i>Del País cv.</i>	0	60	40
<b>Media</b>	<b>35,1</b>	<b>44,8</b>	<b>20</b>

### 3.4. Factores determinantes de la variabilidad

Se realizó el análisis de componentes principales (ACP) incluyendo todas las variables estudiadas en el total de las entradas de la colección de estudio. El propósito del análisis fue obtener un número reducido de combinaciones lineales de las nueve variables en juego que explicaran la mayor variabilidad posible. En este caso, dos componentes se han extraído puesto que dos componentes tuvieron autovalores mayores o iguales que 1 (Tabla 6). Con las dos primeras componentes se explicaba prácticamente el 80 % de la variación total existente.

**Tabla 6. Autovalores, porcentaje del componente y porcentaje acumulado en el análisis de componentes principales de los caracteres cuantitativos.**

Varianza total explicada			
Autovalores iniciales			
Componente	Autovalor	% de la varianza	% Acumulado
1	<b>6,15</b>	<b>68,41</b>	<b>68,41</b>
2	<b>1,04</b>	<b>11,56</b>	<b>79,97</b>
3	0,58	6,44	86,42
4	0,43	4,85	91,28
5	0,30	3,39	94,67
6	0,19	2,20	96,87
7	0,14	1,65	98,53
8	0,08	0,97	99,51
9	0,04	0,49	100,00

La primera componente (CP1), explica más de la mitad de la variación total y está positivamente influenciada por los caracteres número de entrenudos del tallo principal (E), grosor del tallo principal (GTP) y longitud del tallo principal (LTP) (Tabla 7).

La segunda componente explica más del 10 % de la variación y muestra una alta correlación también positiva con los caracteres fin de floración (FF) y número de inflorescencias (I) y una correlación negativa con el área foliar (AF) (Tabla 7).

**Tabla 7: Vectores propios de la matriz de correlación basados en los caracteres morfológicos de *H. coronarium***

Matriz de componentes (a)		
	Componente	
	1	2
Número Entrenudos	<b>0.384</b>	0.008
Área foliar (cm)	0.324	<b>-0.413</b>
Altura (cm)	0.349	-0.292
Fin Floración	0.203	<b>0.741</b>
Número Foliolos	0.312	-0.033
Grosor Tallo Principal (cm)	<b>0.372</b>	-0.132
Inicio Floración	0.329	-0.106
Número Inflorescencias	0.326	<b>0.374</b>
Longitud Tallo Principal (cm )	<b>0.363</b>	0.152

**Nota: Método de extracción: Análisis de componentes principales. a, dos componentes extraídos**

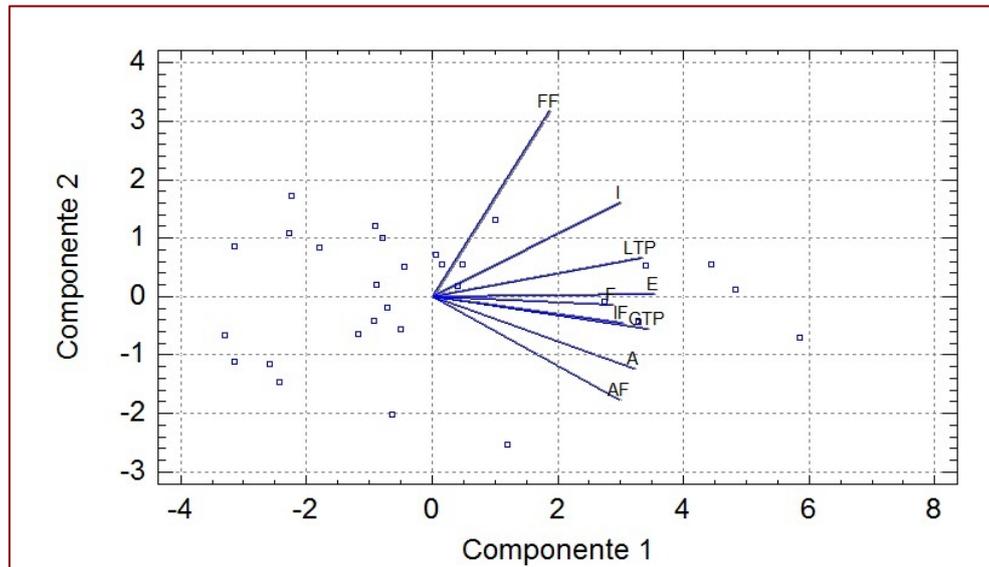
En la Figura 3 se muestra la distribución de las entradas de *H. coronarium* en el biplot de las dos primeras CPs, los vectores de las variables originales y su contribución (representado por la longitud del vector) a las CPs.

Se observa la gran dispersión de los datos, lo que indica una amplia variabilidad genética en esta colección de germoplasma estudiado. De acuerdo con la posición de las entradas en el plano comprendido por ambos ejes se formaron tres grupos. A medida que nos desplazamos hacia la derecha en el eje horizontal (CP1) se incrementa el rendimiento del forraje ya que los caracteres de tipo vegetativo como GTP, LTP y número de entrenudos aumentan, mientras que en los valores positivos de la CP2 se encuentran las plantas con mayor ciclo de floración y con un mayor número de inflorescencias.

En el grupo I se localizan las entradas *Hc-1*, *Hc-25*, *Hc-34*, *Carmen cv.*, *Grimaldi cv.* y *Del País cv.* con las mayores contribuciones en la componente 1, las cuales se destacan por los más altos valores en el grosor y longitud del tallo principal y con un mayor número de entrenudos.

En el grupo II se reúnen las accesiones *Hc-5*, *Hc-6*, *Hc-7*, *Hc-8*, *Hc-13*, *Hc-14*, *Hc-15*, *Hc-16*, *Hc-17*, *Hc-23*, *Hc-29* y *Hc-31* por presentar valores intermedios para las componentes del rendimiento y las de tipo reproductivo. Separados de este grupo pero también con valores intermedios para la componente 1 y con contribuciones negativas para la componente 2 se encuentran las entradas *Hc-24* y *Hc-30*.

Por último, en el grupo III se agrupan las entradas *Hc-3*, *Hc-4*, *Hc-9*, *Hc-10*, *Hc-12*, *Hc-18*, *Hc-27* y *Hc-32*, con las menores contribuciones en la componente 1. A su vez lo dividimos en dos subgrupos en función del ciclo de floración. El subgrupo I con un ciclo de floración amplio y subgrupo II con un ciclo de floración reducido.



**Figura 3:** Distribución gráfica de los genotipos de *H. coronarium* según el análisis de componentes principales basado en las variables cuantitativas analizadas. Las líneas que se cruzan en el (0,0) representan las variables originales (FF, fin de floración; I, número de inflorescencias; LTP, longitud del tallo principal; E, número de entrenudos; F, número de foliolos; IF, inicio de floración; GTP, grosor del tallo principal; A, altura y AF, área foliar). La longitud de cada vector es proporcional a su contribución en las CPs. Los puntos se corresponden con las entradas estudiadas.

#### 4. DISCUSIÓN

Uno de los primeros pasos en un programa de mejora de plantas, una vez definido el ideotipo buscado de planta y el principal carácter o caracteres a reunir, debe consistir en la caracterización y evaluación del germoplasma disponible, para conocer si disponemos o no de la materia prima necesaria.

En este capítulo presentamos un estudio preliminar de la variabilidad presente en nuestra colección de trabajo. Como estrategia a la hora de plantear la caracterización de la colección, tuvimos que optar por incluir más entradas en nuestro estudio o menos entradas con un diseño con repeticiones. En nuestro caso adoptamos la primera opción debido a que los caracteres objeto de estudio presentaban, según la bibliografía, una alta heredabilidad, además de que en nuestros

objetivos se perseguía obtener una idea general de la variabilidad presente en nuestros materiales. Por lo tanto, utilizamos un diseño experimental de clasificación simple, para aumentar en lo máximo posible el número de entradas a caracterizar (IPGRI, 2001)

El comportamiento de las entradas estudiadas respecto a una serie de caracteres muestra la existencia de una amplia variabilidad.

El inicio de floración, expresado como número de días desde el trasplante al desarrollo de la primera flor, estuvo entorno a los 33 días. Ruisi *et al.* (2010) obtuvieron un rango de 15 días para esta característica fenológica en un estudio llevado a cabo en Sicilia en 36 poblaciones naturales de zulla. Issolah y Khalfallah (2007) determinaron un rango de 16 días en Argelia en 14 poblaciones naturales y Flores *et al.* (1997) encontraron un rango de 23 días estudiando 62 entradas principalmente españolas. Como se pone de manifiesto, el rango obtenido para inicio de floración en nuestras poblaciones es el más amplio, sugiriendo que disponemos de más variabilidad, *a priori* que los otros autores para este carácter. Los cultivares Carmen y Del País fueron las entradas más tardías para floración indicando que esta característica fenológica pudo ser considerada por los mejoradores, como en el caso del Grimaldi *cv.* (Bonciarelli y Monotti, 1976). Junto a éstas, las entradas *Hc-1*, *Hc-24* y *Hc-25* también tuvieron una floración tardía, siendo materiales adaptados a nuestras condiciones ambientales y con potencial para ser seleccionadas bajo este enfoque, tratándose de unos de los caracteres más importantes en la mejora genética de la especie (Gutiérrez, 1990). Por otra parte, las entradas precoces en floración podrían estar más adaptadas a ambientes litorales, ya que en zonas continentales las heladas podrían producir daños a este tipo de cultivo.

El estado óptimo de desarrollo en el que la zulla se cosecha para heno es cuando está en plena floración (Leto *et al.*, 2002) y en la región mediterránea la floración tardía sin duda representa una ventaja, ya que maximiza el rendimiento al aumentar el período de crecimiento y establece el período de corte a finales de la primavera reduciendo el riesgo de lluvia durante el proceso de secado sobre el terreno. Por lo expuesto anteriormente podemos señalar que el desarrollo de cultivares de floración tardía podría ser uno de los caracteres para ser considerado en futuros programas de mejora de la especie. La entrada *Hc-9* es la que presentó el ciclo de floración más largo de 122 días, seguida de la *Hc-7* pudiendo ser consideradas como entradas aptas para formar parte de praderas naturales, ya que van a asegurar la regeneración natural de éstas. Este proceso sería más acentuado en este tipo de materiales debido a que su ciclo reproductivo es más largo y por lo tanto producirían más cantidad de semilla, aumentando así su descendencia y asegurando la reposición vegetal de la pradera.

En cuanto a la arquitectura de planta, algunas poblaciones naturales presentaron un hábito de crecimiento postrado, mientras que otras exhibían un crecimiento erecto o en roseta similar que los cultivares comerciales incluidos en este estudio. Esta variabilidad representa una fuente de diversidad intrapoblacional que se podría aprovechar para seleccionar poblaciones de zulla para diferentes usos (producción de heno, pasto, como protectora del suelo, ornamental, etc.)

Se ha observado la existencia de un gran número de correlaciones positivas, siendo una de las más alta la encontrada entre número de entrenudos del tallo principal y longitud del tallo principal y grosor del tallo principal. También se ha constatado la alta correlación existente entre altura y área foliar. De cara a los posibles criterios de mejora, si se seleccionaran las entradas por su altura, las más altas serían las de mayor área foliar, carácter muy importante para su uso como forrajera, pero también incluiríamos las plantas con mayor grosor del tallo principal siendo esto una desventaja ya que el proceso de deshidratación necesitaría más tiempo y cantidad de energía para su secado, factores importantes en el proceso industrial.

El análisis multivariante ha sido usado tradicionalmente como herramienta para medir la diversidad en las colecciones de germoplasma, así como para evaluar la contribución relativa de los diversos caracteres en la variabilidad total en colecciones de cultivos (Baatout, 1995; Marquez-Ortiz *et al.*, 1996). En este trabajo se ha utilizado el análisis multivariante para agrupar las entradas de *H. coronarium* y cuantificar la importancia de los caracteres de diversas plantas en la agrupación de las entradas. Como ha sido expuesto anteriormente, las dos primeras componentes explicaban aproximadamente el 80 % de la variación total existente. Resultados similares fueron obtenidos por Flores *et al.* (1997) en la localidad de Tabajete (Jerez de la Frontera), quienes también con sólo dos componentes logran explicar hasta el 67 %. La primera componente (42 %) estaba asociada positivamente con altura del tallo principal, grosor del tallo principal y decreciendo en importancia con número de entrenudos del tallo principal, área foliar y longitud de la rama del tallo principal. La segunda componente estaba fuertemente asociada sólo con longitud del tallo principal (25 % del total de la variación).

A la vista de los resultados obtenidos en ambos estudios, para la caracterización de los Recursos Fitogenéticos de zulla, es conveniente incluir como descriptores el grosor del tallo principal y la longitud de este, alcanzando con sólo estos dos descriptores más del 50 % de la variabilidad existente.

El análisis de la Figura 4, la cual representa la dispersión de las entradas en el plano de las componentes principales 1 y 2, muestra que las entradas incluidas en el grupo I están caracterizadas por un mayor rendimiento por presentar características vegetativas mayores. Las variedades comerciales están agrupadas en este sector junto con algunas entradas procedentes de

Cádiz (*Hc-1*, *Hc-25* y *Hc-34*). Debido a las particularidades que presentan estas últimas podrían ser seleccionadas para un uso forrajero por tener un mayor porte, definido como tamaño de la planta. Una hipótesis que también se podría plantear de estos resultados sería que estas entradas procedieran de variedades comerciales y así presentarían caracteres parecidos, siendo incluidas en el mismo grupo. El segundo grupo se formó por presentar características intermedias, pudiendo ser seleccionadas para forraje o pasto. Y por último, el grupo III sería el seleccionado para formar parte de los pastos, ya que el porte de estas entradas es menor, posiblemente debido a que formaban parte de praderas. En este caso la selección genética ha llevado a plantas de porte menor y de hábito de crecimiento más rastrero, adaptadas a un tipo de aprovechamiento pascícola. En el grupo se aprecia una diferencia entre entradas con ciclos de floración amplios y reducidos. Esta característica ha podido verse influenciada por el lugar de procedencia de las entradas. Para ambientes litorales, la selección de poblaciones convendría realizarla sobre aquellas plantas que presentarían un periodo de floración más amplio, porque en estas condiciones su ciclo de crecimiento se ampliaría y se podría maximizar sus rendimientos en forraje verde.

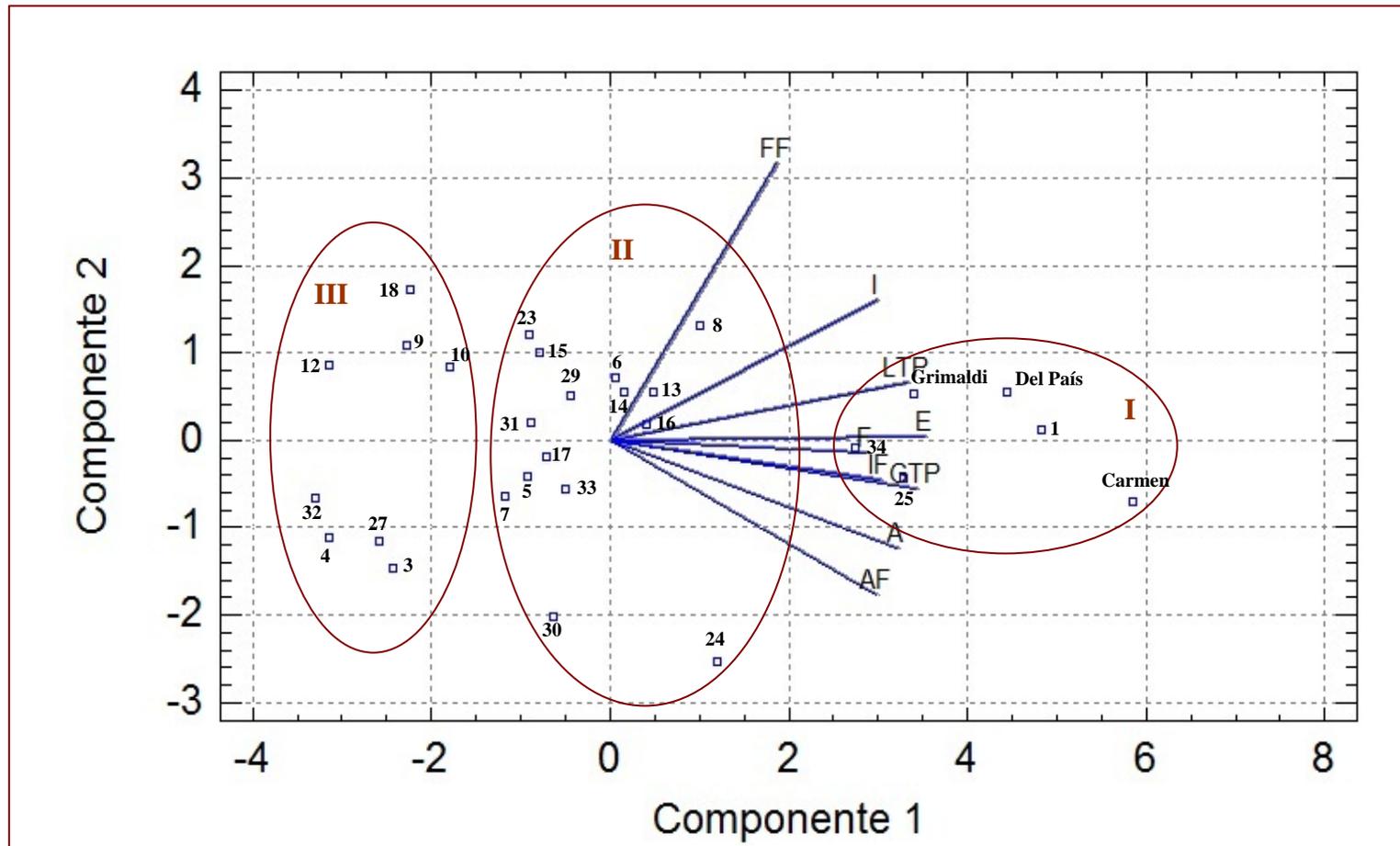


Figura 4: Distribución de los genotipos de *H. coronarium* según el análisis de componentes principales basado en las variables cuantitativas analizadas. Las líneas que se cruzan en el (0,0) representan las variables originales (FF, fin de floración; I, número de inflorescencias; LTP, longitud del tallo principal; E, número de entrenudos; F, número de foliolos; IF, inicio de floración; GTP, grosor del tallo principal; A, altura y AF, área foliar). Grupo I: entradas *Hc-1*, *Hc-25*, *Hc-34*, *Carmen cv.*, *Grimaldi cv.* y *Del País cv.*, Grupo II: *Hc-5*, *Hc-6*, *Hc-7*, *Hc-8*, *Hc-13*, *Hc-14*, *Hc-15*, *Hc-16*, *Hc-17*, *Hc-23*, *Hc-24*, *Hc-29*, *Hc-30* y *Hc-31* y Grupo III: *Hc-3*, *Hc-4*, *Hc-9*, *Hc-10*, *Hc-12*, *Hc-18*, *Hc-27* y *Hc-32*.

Bajo el prisma de un mejorador vegetal, disponer de variabilidad en una especie de tanto potencial como es la zulla, supone un abrir de puertas en su mejora, prácticamente inexistente hasta este momento, con el fin último de su mayor aprovechamiento y necesaria integración en sistemas de secano.

Por lo tanto no sólo se ha colectado un material con serios problemas de erosión genética, el cual va a ser preservado en el CRF (INIA) y en la colección de trabajo para su uso por generaciones futuras, sino que será la materia prima para el incipiente Programa de mejora de la especie.

## 5. REFERENCIAS

- Baatout, H., 1995. Morphological contrasts between *Hedysarum spinosissimum* ssp *spinosissimum* and ssp *capitatum* warrant recognition of separate species. *Can J Bot- Rev Can Bot.*,73 (4): 566-572.
- Baatout, H., Combes, D., Marrakchi, M., 1991. Reproductive system and population structure in two *Hedysarum* subspecies. I. Genetic variation within and between populations. *Genome*, 34: 396-406.
- Batista, J.M., Martínez, M.R., 1989. Análisis multivariante. Análisis de componentes principales. (Ed.) Editorial Hispano Europea, S.A. Barcelona.
- Boussaïd, M., Ben Fadhel, N., Trifi-Farah, N., Abdelkefi, A., Marrakchi, M., 1995. Les espèces Méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. En : Ressources Génétiques des Plantes Fourragères et à Gazon. (Eds.) Prosperi, J.M., Guy, P., Balfourier, F. BRG-INRA: Paris. pp 115-130.
- Bonciarelli F., Monotti M., 1976. Grimaldi Una nuova varieta di sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Revista di agronomia*, 10: 52-56.
- Cuadras, C.M., 1981. Método de análisis multivariante. (Ed.) Eunibar. Barcelona.
- Everitt, B., 1978. Graphical techniques for multivariate data. North-Holland. New York.
- Figier, J., Espagnac, H., Combes, D., Francillon, G., 1978. Mise en évidence de types morphologiques dans les populations naturelles de l'*Hedysarum coronarium* L. de Tunisie par analyse multivariable. *Rev Gen Bot*, 85: 21-62.
- Flores, F., Gutierrez, J.C., Lopez, J., Moreno, M.T., Cubero J.I., 1997. Multivariate analysis approach to evaluate a germplasm collection of *Hedysarum coronarium* L. *Genet Resour Crop Evol.*, 44: 545-555.
- Gepts, P., 2000. A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering. *Crop Sci.*, 42: 1780-1790.
- Gutiérrez Mas, J.C., 1982. *Hedysarum coronarium* L.: estudio de su variabilidad y utilización en mejora genética. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

- Gutiérrez Mas, J.C., 1990. Mejora genética de la zulla cultivada. Agricultura: Revista agropecuaria. 699: 876-881.
- IPGRI. 2001. The design and analysis of evaluation trials of genetic resources collections. A guide for genebank managers. International Plant Genetic Resources Institute Technical, Bulletin N°. 4, Italy.
- Issolah, R., Knalfallah, N., 2007. Analysis of the morpho-physiological variation within some Algerian populations of sulla (*Hedysarum coronarium* L., *Fabaceae*). J Biol Sci., 7: 1082-1091.
- Leto, G., Todaro, M., Di Noto, A.M., Alicata, M.L., 2002. Comparison of Sulla-hay and Sulla-silage in the lactating ewes and their effects on milk and cheese characteristics. Small Rumin Res., 45: 301-306.
- Marshall, D.R., Brown, A.H.D., 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. En: Crops genetic Resources for today and tomorrow. (Eds.) Frankel, O.H., Hawkes, J.G. Cambridge University Press. Chapter 4.
- Marquez-Ortiz, J.J., Johnson, L.D., Barnes, D.K., Basigalup, D.H., 1996. Crown morphology relationships among alfalfa plant introductions and cultivars. Crop Sci., 36: 766-770.
- Monotti, M., Porceddu, E., 1976. Valutazione di ecotipi di sulla coltivari a piante spaziate ed in semina fitta. Revista de Agronomía 10: 151-157.
- Nuez, F., Ruíz, J.J., 1999. La Biodiversidad agrícola valenciana: Estrategias para su conservación y utilización, Universidad Politécnica de Valencia.
- Pearson, K., 1901. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. Phil Mag., 2 (6): 559-572.
- Reyes, J., 1994. Introducción a Statgraphics. ICE. Universidad de Córdoba.
- Ruisi, P., Siragusa, M., Di Giorgio, G., Graziano, D., Amato, G., Carimi, F., Giambalvo, D., 2010. Pheno-morphological, agronomic and genetic diversity among natural populations os sulla (*Hedysarum coronarium* L.) collected in Sicily, Italy. Genet Resour Crop Evol., 58(2): 245-257.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1982. Métodos estadísticos. Cia. (Ed.)Continental, S.A. de CV., Mexico.
- Tyler, B.F., Chorlton, K.H., Thomas, I.D., 1987. Collection, characterization and utilization of genetic resources of temperate forage grass and clover. En: Collection, characterization and utilization of genetic resources of temperate forage grass and clover. (Ed.) Tyler, B.F. IBPGR, Rome. p. 1.



## **CAPÍTULO II**

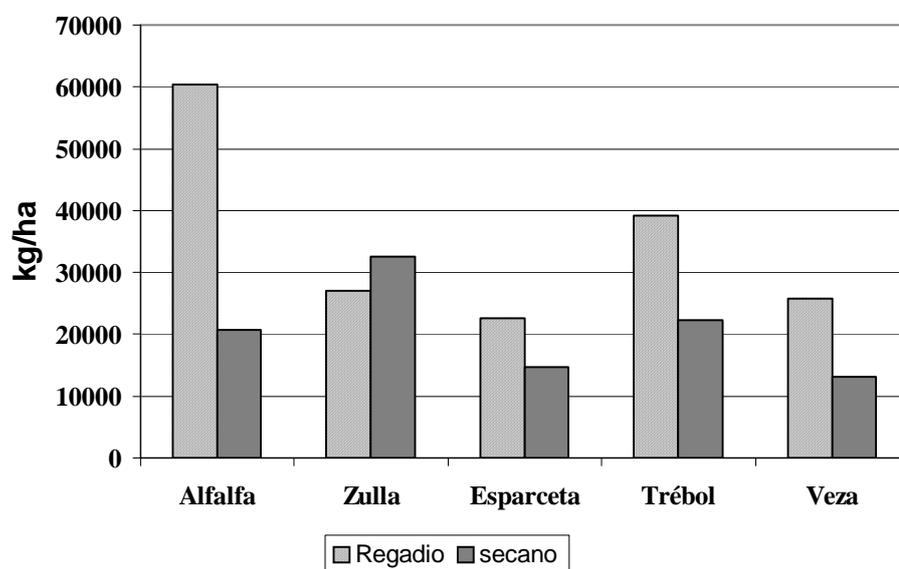
---

**Adaptación y respuesta agronómica de *Hedysarum coronarium* L. en diferentes agrosistemas de secano mediterráneos**



## 1. INTRODUCCIÓN

El MARM (2009, últimos datos disponibles) ofrece en su Anuario de Estadística, los valores medios de rendimiento de distintas especies cultivadas para su aprovechamiento como forraje en España. Sorprenden los rendimientos de *Hedysarum coronarium* L. en condiciones de secano (Figura 1) que son muy superiores a otras leguminosas forrajeras cultivadas. Sin embargo, y a pesar de dichos “rendimientos” actualmente sólo se cultiva en Baleares y Castilla y León, 1.023 y 13 ha, respectivamente, encontrándose de forma espontánea como ya se expuso en el Capítulo I, en la provincia de Cádiz.



**Figura 1: Rendimientos medios para España de leguminosas forrajeras (año 2004, último año disponible) (Fuente: MARM)**

Debido al gran potencial que tiene como forrajera adaptada a condiciones de secano, sería de gran interés evaluar su respuesta agronómica en diferentes ambientes potenciales de cultivo, con objeto de contar con otra especie a incluir, con criterios racionales, en las alternativas de cultivo de nuestros secanos.

Por lo anteriormente expuesto, se propuso el objetivo de “Estudiar la respuesta agronómica de *H. coronarium* en distintas condiciones de secano mediterráneas”

Para ello se plantearon dos estrategias: la primera, correspondiente al primer ensayo fue identificar los ecotipos de mayor respuesta en rendimiento de forraje y calidad en las condiciones ensayadas para el manejo tradicional, y la segunda estrategia correspondiente al segundo ensayo, evaluar el comportamiento productivo del cultivo de *H. coronarium* sometido a diferentes regímenes de aprovechamiento (fecha de siega) en dos ambientes contrastantes.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Características edafoclimáticas de los ambientes experimentales.**

El primero de estos ensayos se desarrolló durante dos años (2009/10 y 2010/11) y se estableció el 25 de noviembre del 2009, en la finca experimental del IFAPA Centro “Rancho de la Merced” situado en Jerez de la Frontera en la provincia de Cádiz, sobre suelo franco arcilloso y en condiciones de secano. Las precipitaciones y temperaturas medias mensuales de ambas campañas agrícolas se recogen en la Figura 2.

El segundo experimento se realizó durante un año (2009/10) y fue establecido en otoño del 2009, también en condiciones de secano y en dos ambientes contrastantes: (1) en la finca experimental anteriormente indicada, y (2) en un área montañosa de Palermo (Sicilia), sobre un suelo de orden Inceptisol (con débil desarrollo de horizontes). El lugar de estudio era de clima mediterráneo semiárido (según la definición de Emberger, 1955) y el total de precipitaciones en ese año fueron 800 mm anuales, concentrándose en el periodo de septiembre-octubre (254 mm) y enero-febrero (274.8 mm) (Figura 3).

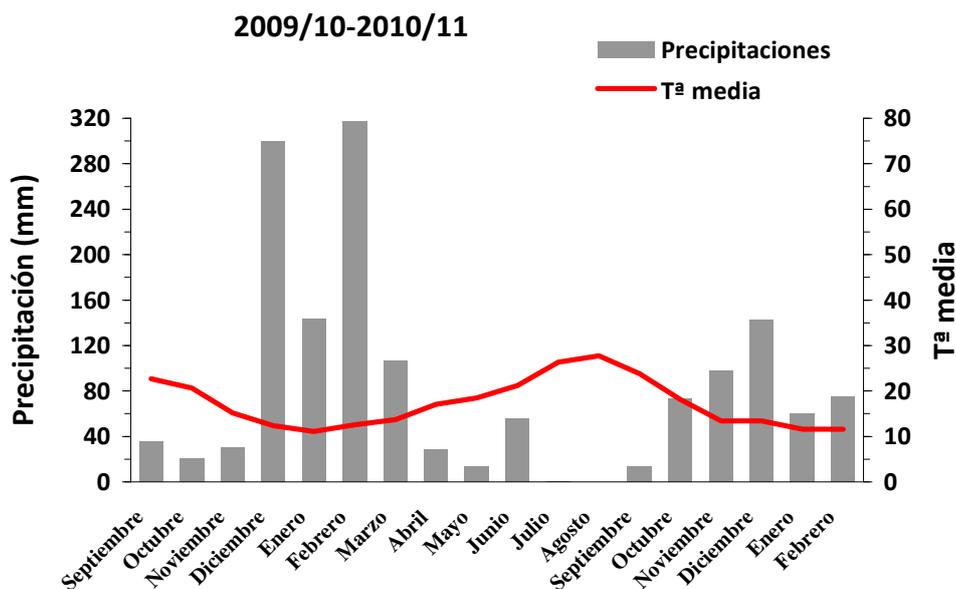


Figura 2: Distribución de las precipitaciones y Tª media mensual durante los dos años del ensayo 2009/10 y 2010/11 en la finca experimental del IFAPA Centro “Rancho de la Merced”.

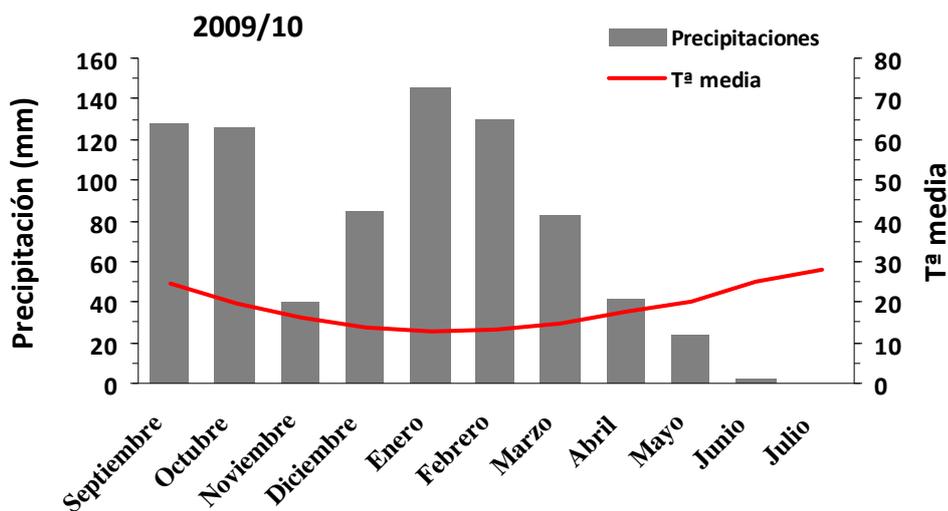


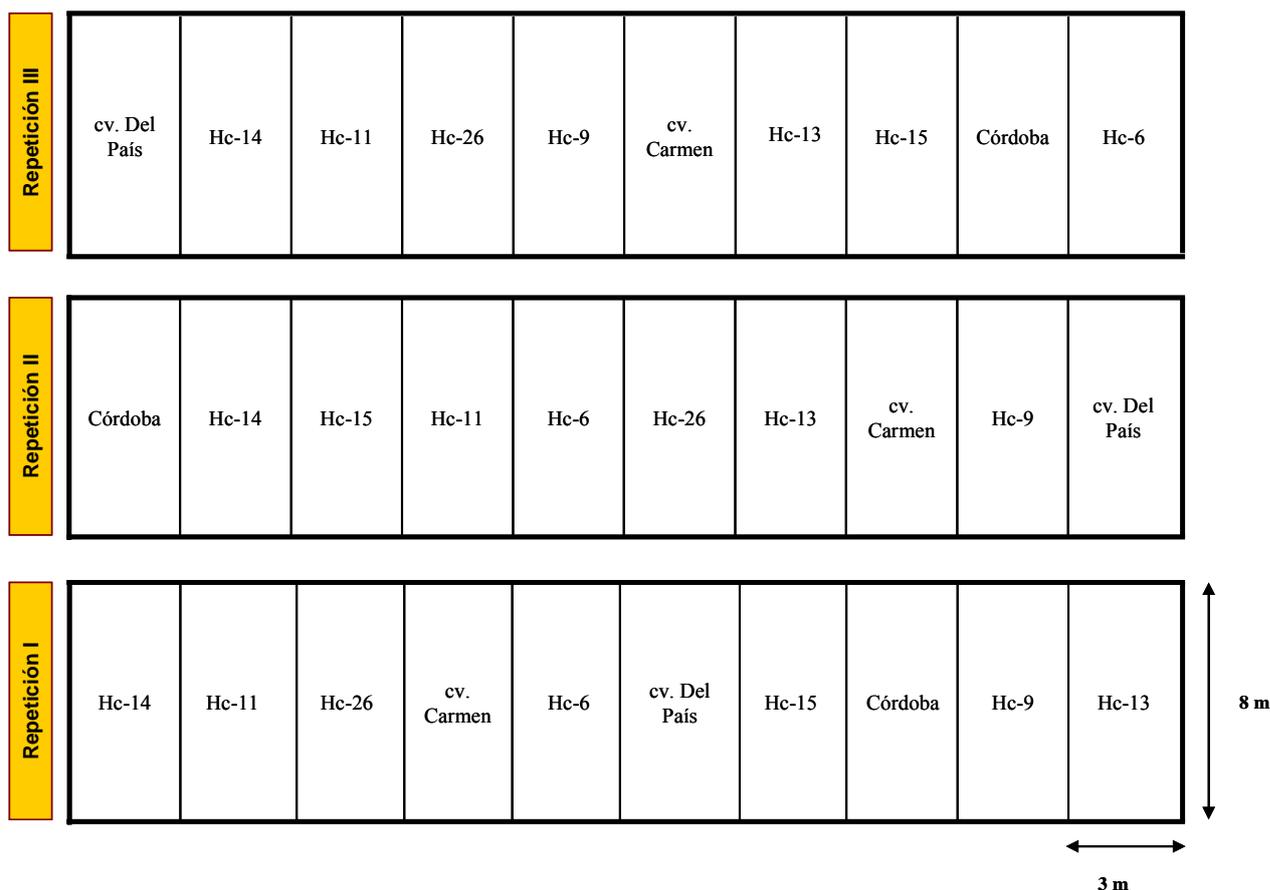
Figura 3: Distribución de las precipitaciones y Tª media mensual desde septiembre a julio en la campaña agrícola 2009/10 en un área montañosa de Palermo (Sicilia)

## 2.2. Material vegetal y evaluación agronómica de los dos ensayos realizados.

En el primer ensayo, el material vegetal utilizado para la evaluación agronómica fueron siete ecotipos de zulla que formaban parte de nuestra colección de trabajo (*Hc-6*, *Hc-9*, *Hc-11*, *Hc-13*, *Hc-14*, *Hc-15* y *Hc-26*). En la Tabla 1, del Capítulo I (página 50), se muestran sus datos de pasaporte. Estos ecotipos fueron multiplicados y caracterizados en la campaña 2005/06 en la finca experimental del IFAPA Centro "Las Torres-Tomejil", presentando un gran potencial como cultivos forrajeros, razón por la cual fueron incluidos en este estudio. También se incluyó la línea de mejora en fase de desarrollo "Córdoba" del programa de mejora iniciado en esta Tesis y dos variedades comerciales, Carmen *cv.* y Del País *cv.* que fueron usadas como controles.

La preparación del suelo consistió en una labranza convencional (arado y pase de vibrocultor). La densidad de siembra fue de 500 semillas descascarilladas/m<sup>2</sup> (aproximadamente 25 kg/ha) y el diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones (Figura 4). Las dimensiones de las parcelas elementales fueron de 8x3 m, estando formadas por 14 surcos separados entre si 0,2 m. Después de la siembra se dio un pase de rulo para conseguir un mejor contacto entre el suelo y las semillas. No se hizo ningún tipo de fertilización del suelo.





**Figura 4: Diseño de bloques al azar con tres repeticiones utilizado para la evaluación agronómica de diferentes ecotipos de zulla en Jerez.**

En el año de implantación del ensayo (2009/10), para cada entrada, se determinó el 26 de abril del 2010 la producción de forraje verde (materia fresca), el rendimiento de la materia seca (RMS) y el contenido de proteína sobre la materia seca (PMS). La producción de forraje verde se evaluó por la siega de un área de 2,4 m<sup>2</sup> situada al azar sobre los surcos centrales de la parcela. Para obtener la producción de MS fue necesario obtener tres datos importantes: el peso fresco de la muestra, que correspondió al total del material vegetativo que se obtuvo del corte de 2,4 m<sup>2</sup>, el peso fresco de la submuestra, la cual se extrajo al azar de la muestra mencionada anteriormente, y el peso seco de la submuestra.

El peso de la muestra en fresco se efectuó inmediatamente después de haber cortado el material en el campo, utilizando una balanza portátil. A continuación, de esta muestra se obtuvo una submuestra de forraje verde de zulla que se pesó y colocó en una estufa de secado a 50 °C durante una semana. Una vez seca se volvió a pesar y se determinó el contenido en proteína bruta (nitrógeno total) por el método establecido en el Real Decreto 2257/1994. Dicho análisis fue realizado por el Laboratorio Regional Agrario de Córdoba de la Junta de Andalucía.

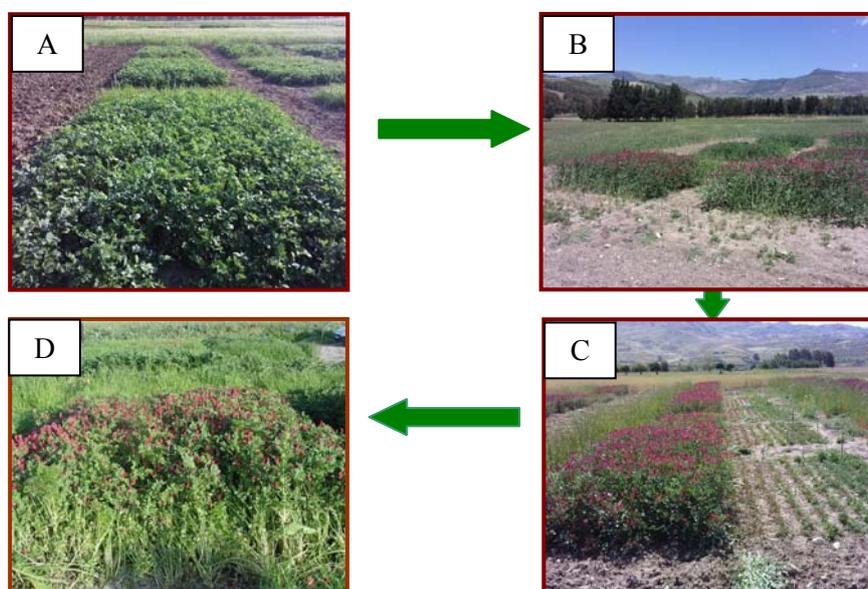
Al comienzo del otoño (4/11/2010) se efectuó un conteo del número de plantas en cada parcela, distinguiéndose las procedentes de rebrotes de cepas del año anterior, de las nuevas plantas procedentes de semilla, para evaluar la capacidad de rebrote y de implantación de cada ecotipo de zulla. La superficie de muestreo fue limitada a un marco de 0,25 m<sup>2</sup>.

En el segundo año del cultivo (2010/11), la siega tuvo lugar el 25 de febrero del 2011 y se realizó idéntico tratamiento, es decir, se determinó la producción de forraje verde, el rendimiento de la materia seca y el contenido de proteína en la MS. La metodología seguida fue similar a la realizada el primer año.

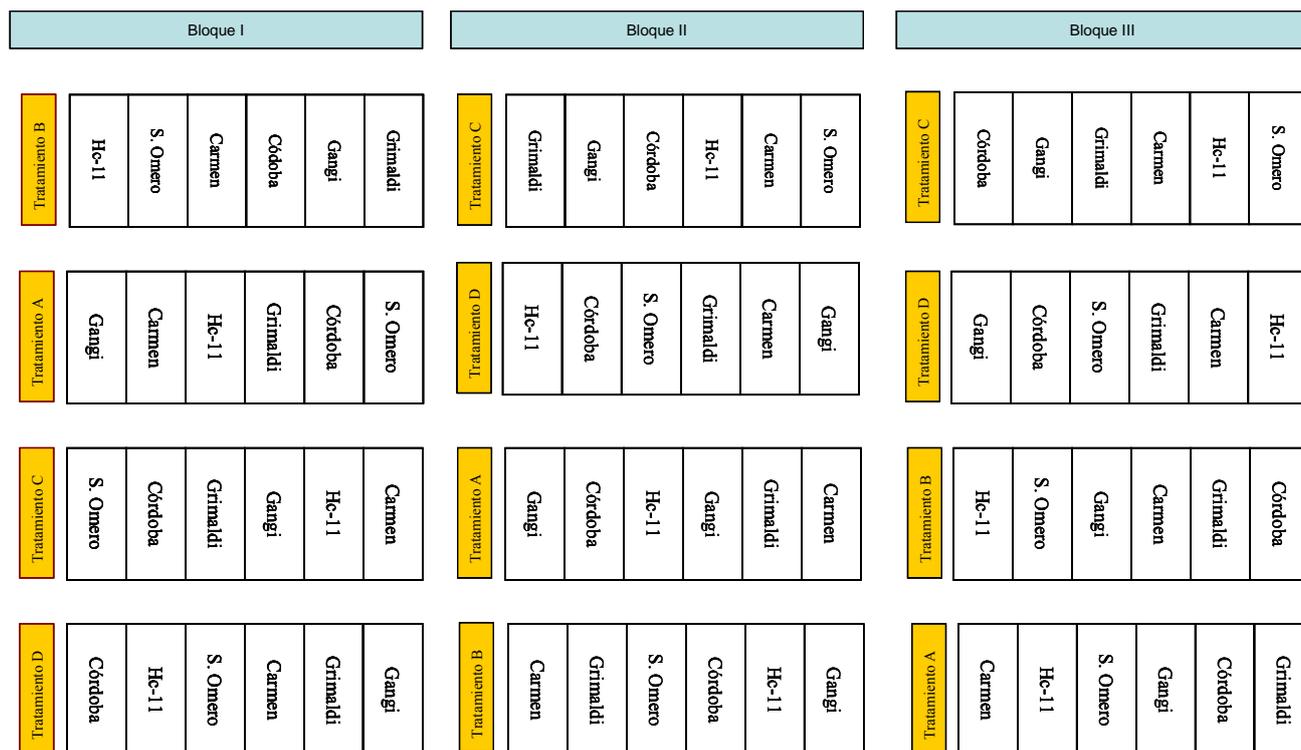
El material vegetal del segundo ensayo realizado en dos ambientes contrastantes, Jerez (Andalucía) y Palermo (Sicilia), estuvo formado por un ecotipo de nuestra colección de trabajo (*Hc-11*), la línea “Córdoba”, un agroecotipo siciliano “Gangi” y las variedades S. Omero, Carmen y Grimaldi. La preparación del suelo, al igual que en el caso anterior consistió en una labranza convencional. La siembra se realizó el 25 de noviembre del 2009 y la dosis fue de 400 semillas/m<sup>2</sup> (aproximadamente 20 kg/ha) distribuidas en tres filas de tres metros de longitud y separadas entre sí 0,2 m. El diseño experimental fue de parcelas divididas con tres repeticiones (Figura 5), siendo el tamaño de las subparcelas de 2,25 m<sup>2</sup>.

A cada uno de los genotipos estudiados en este ensayo, se evaluó su producción de forraje verde (materia fresca) y el rendimiento de la materia seca (RMS). Los tratamientos aplicados A, B, C y D consistieron en distintas fechas de siega y se realizaron como se indica a continuación:

- Tratamiento A: la siega se realizó a los 177 días desde la siembra.
- Tratamiento B: a los 199 días desde la siembra.
- Tratamiento C: a los 212 días desde la siembra
- Tratamiento D: a los 223 días desde la siembra.



La superficie de la muestra para evaluar el forraje verde correspondía a un área aproximada de 2,25 m<sup>2</sup>, es decir, el tamaño de la subparcela. De este material se tomó una muestra al azar de forraje de zulla y se secó a 50 °C para determinar el contenido de MS.



**Figura 5: Diseño experimental de parcelas divididas para evaluar la fecha de siega en el cultivo *H. coronarium*, establecido en dos ambientes: Jerez (Andalucía) y Palermo (Sicilia).**

### 2.3. Análisis estadísticos

Con los datos obtenidos del primer ensayo se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) según el diseño preestablecido (bloques al azar), para la producción de forraje verde, RMS y el contenido de proteína sobre la MS. Las diferencias entre los ecotipos/variedades se establecieron mediante el análisis de comparación de medias, empleando el test de Tukey a nivel de significación  $P < 0,05$ .

Por otra parte, con el fin de conocer las relaciones entre algunos de los parámetros evaluados utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson (r):

$$r = (\sum xy) / \sqrt{(\sum x^2)(\sum y^2)}$$

En el ensayo segundo, se hizo un análisis de la varianza combinado (ANOVA) según el diseño utilizado (split-plot), para la producción de forraje verde y rendimiento de la materia seca, considerando tres factores (ambiente, tratamiento y genotipo) y la interacción entre ellos.

Las interacciones genotipo x ambiente y tratamiento x ambiente fueron significativas y los datos se analizaron de forma separada para los dos ambientes de este estudio. Se realizó un análisis de la varianza para cada parámetro estudiado, donde tratamiento fue el principal factor y genotipo fue el subfactor. La comparación de medias como en el primer ensayo se hizo utilizando el test de Tukey a nivel de significación  $P < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Identificación de ecotipos de mayor respuesta en rendimiento de forraje y calidad en las condiciones ensayadas para el manejo tradicional.**

Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran los parámetros referentes a la calidad de cada genotipo y los datos de producción de los mismos en kg/ha, correspondiendo estos datos a la media de las tres repeticiones. También se presentan los valores medios de los parámetros anteriormente indicados del total de genotipos evaluados. Igualmente se hace constar la mínima diferencia significativa (MDS) entre variedades, al 5%, lo cual supone que, para que una variedad sea significativamente superior a otra, la diferencia entre ambas tiene que ser superior al valor de la MDS. Es decir, que dos variedades distintas en rendimientos, pero cuyas diferencias de producción sean inferiores a la MDS, son estadísticamente similares y su diferencia en rendimiento es debida al azar. Se da también el dato del coeficiente de variación (C.V.), que es una medida o estimación de la variabilidad del mismo. Coeficientes bajos indican una variabilidad pequeña o aceptable; coeficientes altos, una variabilidad alta y no hacen los resultados fiables.

En nuestro estudio, para el primer ciclo del cultivo, los ecotipos de *H. coronarium* presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la producción de forraje verde, RMS y contenido de proteína sobre MS. Los coeficientes de variación 9,05; 11,12 y 8,76 respectivamente, fueron relativamente bajos en todos los casos, indicándonos que nuestros resultados eran fiables. La producción media anual de forraje verde estuvo en torno a 29.040 kg/ha, lo que dio lugar a 3.082 kg/ha de materia seca y alrededor de 700 kg/ha de proteína (Tabla 1). Cuando se compararon las medias de la producción de forraje verde de los diferentes ecotipos, los resultados obtenidos mostraron que la variedad “Del País” fue de las que obtuvieron un mayor rendimiento. Para RMS,

esta variedad volvió a estar en el grupo que obtuvo más rendimiento junto con la *Hc-14*, *Hc-9*, *Hc-15*, *Hc-26*, *Hc-11*, *Hc-6*, Córdoba y Carmen cv. y para el contenido en proteína sobre MS, la *Hc-14* fue la que mostró una mayor cantidad (843,25 kg/ha). En todos los casos, la *Hc-13* fue la que generó menor kg/ha de forraje verde, RMS y contenido de proteína (428,89 kg/ha).

**Tabla 1: Media anual de producción de *Hedysarum coronarium*, durante su primer ciclo de cultivo.**

Variedad /ecotipo	Producción de forraje verde kg/ha	Rendimiento de Materia Seca kg/ha	Proteína sobre Materia Seca kg/ha
<b>Hc-14</b>	35.665 ab	3.782,6a	843,25a
<b>Hc-9</b>	33.866 abc	3.728,5a	832,95ab
<b>Hc-15</b>	27.917 cd	3.113,1a	764,68abc
<b>Hc-26</b>	29.753 abcd	3.063,7a	729,25abc
<b>Hc-11</b>	25.908 d	3.058,1a	655,95bc
<b>Hc-6</b>	27.353 cd	2.834,2a	660,07bc
<b>Hc-13</b>	13.942 e	1.529,5b	428,89d
<b>Córdoba</b>	30.278 abcd	3.092,3a	639,48c
<b>Del País cv.</b>	37.321a	3.764,8a	796,17abc
<b>Carmen cv.</b>	28.394 bcd	2.855,9a	731,39abc
<b>Media (kg/ha)</b>	29.040	3.082,3	708,21
<b>C.V. %</b>	9,05	11,12	8,76
<b>MDS (5%)</b>	7.693,6	1.002,5	181,58

**Nota: Las poblaciones con distintas letras son estadísticamente diferentes para  $P < 0,05$  (Test de Tukey's). C.V.: coeficiente de variación y MDS: mínima diferencia significativa.**

Los resultados de los conteos del número de plantas de cada parcela se muestran en la Tabla 2, y se observa que las entradas presentaron diferencias significativas para el número de plantas nacidas de semilla pero no para el número de plantas del año anterior que rebrotaron y los coeficientes de variación obtenidos fueron 15,3 y 28,3 respectivamente. Cuando se hizo la comparación de medias entre los diferentes genotipos, los resultados mostraron que la *Hc-26* presentaba el mayor número de plantas nacidas de semillas y el “Del País” cv. el menor, siendo estadísticamente diferentes. Por otra parte, para el número de plantas de rebrote, el análisis determinó que no existían diferencias significativas.

**Tabla 2: Número de plantas nacidas de semilla y plantas del año anterior rebrotadas de *Hedysarum coronarium* L.**

<b>Variedad /ecotipo</b>	<b>Rebrotos de cepa</b>	<b>Plantas de semilla</b>
<b>Hc-14</b>	7,6	306,14bcd
<b>Hc-9</b>	9,6	243,67cde
<b>Hc-15</b>	10,3	140,6ef
<b>Hc-26</b>	9,6	443a
<b>Hc-11</b>	5,5	192,6def
<b>Hc-6</b>	9,6	340abc
<b>Hc-13</b>	9	416,9ab
<b>Córdoba</b>	9	316,1abcd
<b>Del País cv.</b>	6	106,1f
<b>Carmen cv.</b>	6,7	370,4abc
<b>Media</b>	8,3	287,5
<b>C.V. %</b>	28,3	15,3
<b>MDS (5%)</b>	6,9	129

**Nota: Las poblaciones con distintas letras son estadísticamente diferentes para  $P < 0,05$  (Test de Tukey's). La superficie muestreada correspondía a un área de  $0,25 \text{ m}^2$ . C.V. coeficiente de variación; MDS: mínima diferencia significativa.**

Por último se hizo un análisis de correlación entre los parámetros, producción de forraje verde del primer ciclo del cultivo, número de plantas de semilla y de rebrote. En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de correlación entre las variables evaluadas, presentando valores muy próximos a 1 y por lo tanto una alta correlación entre ellos. La correlación más alta fue entre número de plantas de rebrote y producción de forraje verde, con un valor de 0,91. También se observó una alta correlación prácticamente similar a la anterior, entre número de plantas de semilla y plantas de rebrote. Los  $P$ -valores obtenidos presentaban valores por debajo de 0,05 indicándonos un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 3: Correlaciones entre los diferentes parámetros evaluados.**

	Rebrotos de cepa	Plantas de semilla
<b>Plantas de semilla</b>	0,90	
<b>P-Valor</b>	0,00	
<b>Producción forraje</b>		
<b>verde (kg/ha)</b>	<b>0,91</b>	0,86
<b>P-Valor</b>	0,00	0,00

**Nota: P-valores debajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de 0, con un nivel de confianza del 95 %**

Los resultados obtenidos en el segundo año del cultivo (Tabla 4) no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre las diferentes variedades/ecotipos de zulla para la producción de forraje verde y RMS. Los C.V. fueron de 13,39 para el análisis del RMS y de 11,75 para la producción de forraje verde. La producción media anual de forraje verde y el RMS en este segundo año fueron algo superiores al año anterior, estando entorno a 37.500 kg/ha y 3.800 kg/ha respectivamente. Sin embargo, para el contenido de proteína sobre MS, el análisis estableció diferencias significativas entre genotipos, presentando este parámetro un C.V. de 8,59 (Tabla 4). La media anual del contenido de proteína sobre MS fue un 16 % superior al año anterior. Todos los ecotipos, excepto en *Hc-14* y *Hc-9*, mostraron un mayor contenido de proteína en este segundo año de cultivo. En ese año la *Hc-6* fue la que obtuvo una mayor cantidad de proteína seguida de la línea Córdoba, presentando de nuevo la *Hc-13* el menor valor (699,2 kg proteína sobre MS/ha)

**Tabla 4: Media anual de producción de *Hedysarum coronarium*, durante su segundo ciclo de cultivo.**

Variedad /ecotipo	Producción de forraje verde kg/ha	Rendimiento de Materia Seca kg/ha	Proteína sobre Materia Seca kg/ha
<b>Hc-14</b>	35.348	3.548,8	760,4bc
<b>Hc-9</b>	33.173	3.398,3	798,6bc
<b>Hc-15</b>	36.907	3.768,7	824,21abc
<b>Hc-26</b>	37.661	3.884,0	808,12abc
<b>Hc-11</b>	40.827	3.963,8	788,21bc
<b>Hc-6</b>	41.863	4.173,4	1015,4a
<b>Hc-13</b>	33.863	3.398,0	699,2c
<b>Córdoba</b>	44.782	4.578,0	934,12ab
<b>Del País cv.</b>	36.470	3.861,3	870,3abc
<b>Carmen cv.</b>	34.478	3.622,0	759,0bc
<b>Media</b>	37.537	3.819,6	821,22
<b>C.V. %</b>	11,75	13,39	8,59
<b>MDS (5%)</b>	12.908	1.496,5	208,07

**Nota: C.V.: coeficiente de variación y MDS: mínima diferencia significativa.**

En este segundo año, también se hizo un análisis de correlación, entre la producción de forraje verde del segundo año y el número de plantas de semilla y de rebrote. En la Tabla 5 se observan los coeficientes de correlación, mostrando claramente una fuerte correlación entre todos los parámetros analizados. En este año la correlación más alta y similar a la obtenida en el primer año fue entre plantas rebrotadas de cepa y producción de forraje verde, aunque las otras correlaciones fueron prácticamente similares a la anterior.

**Tabla 5: Correlaciones entre los diferentes parámetros evaluados en el segundo ciclo del cultivo.**

	Rebrotos de cepa	Plantas de semilla
<b>Plantas de semilla</b>	0,90	
<b>P-Valor</b>	0,00	
<b>Producción forraje</b>		
<b>verde (kg/ha)</b>	<b>0,95</b>	0,92
<b>P-Valor</b>	0,00	0,00

Nota: *P*-valores debajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de 0, con un nivel de confianza del 95 %

### 3.2. Evaluación del comportamiento productivo del cultivo de *H. coronarium* sometido a diferentes regímenes de aprovechamiento (fecha de siega) en dos ambientes contrastantes.

Los resultados obtenidos del análisis de la varianza combinado para los parámetros evaluados mostraron diferencias significativas ( $P < 0,001$  y  $P < 0,05$ ) para todas las fuentes de variación y todos los tipos de interacciones excepto para Bloque que presentó  $P > 0,05$  (Tabla 6 y Tabla 7).

**Tablas 6: Resultados del análisis de la varianza conjunto de la producción de forraje verde**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados* $10^{-6}$	Cuadrados medios* $10^{-6}$
Bloques (B)	2	9,37	4,68ns
Ambientes (A)	1	11.080	11.080***
Tratamientos (T)	3	3514	1.171***
AxT	3	789,9	263,3***
Error BxAxT	14	250,9	17,92
Genotipos (G)	5	2274	454,8***
AxG	5	648,3	129,6***
TxG	15	700,5	46,7***
AxTxG	15	355,5	23,7*
Error BxAxTxG	80	848,6	10,6
Total	143	20.480	
CV (BxAxT)		16,74	
CV (BxAxTxG)		12,88	

Nota: \*, \*\*, \*\*\*. Significativo al 0,05, 0,01 y 0,001 de probabilidad. Ns: No significativo

**Tabla 7: Resultados del análisis de la varianza conjunto para el rendimiento de la materia seca (RMS)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados*10 <sup>-4</sup>	Cuadrados medios*10 <sup>-6</sup>
Bloques (B)	2	6,00	3,00ns
Ambientes (A)	1	40.110	40.110***
Tratamientos (T)	3	34.160	11.380***
AxT	3	1.150	383,55*
Error BxAxT	14	1.226	87,61
Genotipos (G)	5	9.536	1.907***
AxG	5	2.827	565,48***
TxG	15	2.766	184,43ns
AxTxG	15	2.812	187,45ns
Error BxAxTxG	80	6.088	76,09
Total	143	100.600	
CV (BxAxT)		17,05	
CV (BxAxTxG)		15,89	

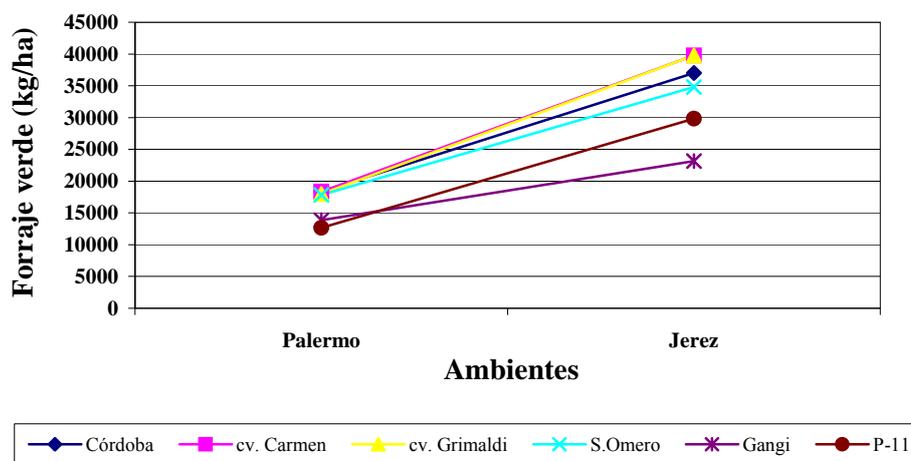
**Nota: \*, \*\*, \*\*\*. Significativo al 0,05, 0,01 y 0,001 de probabilidad. Ns: No significativo**

La interacción genotipo x ambiente al ser significativa, indicaba que no serían los valores medios de producción de cada genotipo utilizables para recomendaciones generales, pues dicha interacción estaría mostrando una respuesta diferenciada de cada genotipo según el ambiente. Por este motivo, los datos tuvieron que ser analizados de forma separada para cada una de las dos localidades de estudio. En la Figura 6 y 7 se muestran los tipos de interacciones para la producción de forraje verde y RMS. Todos los genotipos presentaron un incremento en su rendimiento al pasar de Palermo a Jerez, pero no todos aumentaron de la misma forma. En ambos casos, el tipo de interacción fue cualitativa, porque los genotipos cambiaron el orden de jerarquía o ranking al cambiar el ambiente, lo que introducía un grado de incertidumbre en la medición de la superioridad de algunos genotipos (De Lacy *et al.*, 1996). Para la producción de forraje verde, sólo un genotipo presentó un comportamiento estable (S. Omero), mostrando los restantes una respuesta diferenciada según el ambiente. En cambio, para el RMS, S. Omero, Gangi y *Hc-11* fueron los que se comportaron de forma estable y la línea Córdoba y los cultivares Carmen y Grimaldi de forma diferenciada.

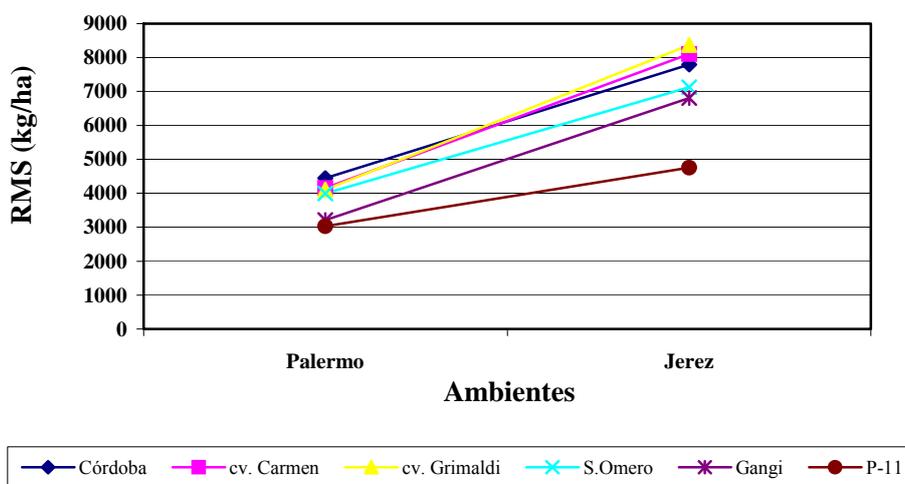
Los genotipos que obtuvieron una mayor producción de forraje verde para la localidad de Jerez, fueron Carmen, Grimaldi y Córdoba siendo estadísticamente similares y para el RMS sólo Grimaldi formó el grupo de mayor rendimiento, seguido de Carmen, Córdoba y S. Omero que para

este parámetro fueron estadísticamente diferentes al anterior. Por otro lado, para los dos parámetros evaluados, los genotipos que formaron los grupos de menor producción fueron *Hc-11* y Gangi.

En la localidad de Palermo, el grupo establecido para los genotipos que obtuvieron una mayor producción de forraje verde, fue similar al de Jerez pero en este caso se incluyó el cultivar S. Omero. En cambio para el RMS la línea Córdoba destacó por una mayor producción, siendo Carmen, Grimaldi y S. Omero diferentes estadísticamente al anterior. Los genotipos de menor producción de forraje verde y RMS resultaron ser los mismos que los identificados en la localidad de Jerez.



**Figura 6: Comportamiento de los genotipos de *H. coronarium* y valores medios de forraje verde (kg/ha) en los dos ambientes estudiados.**

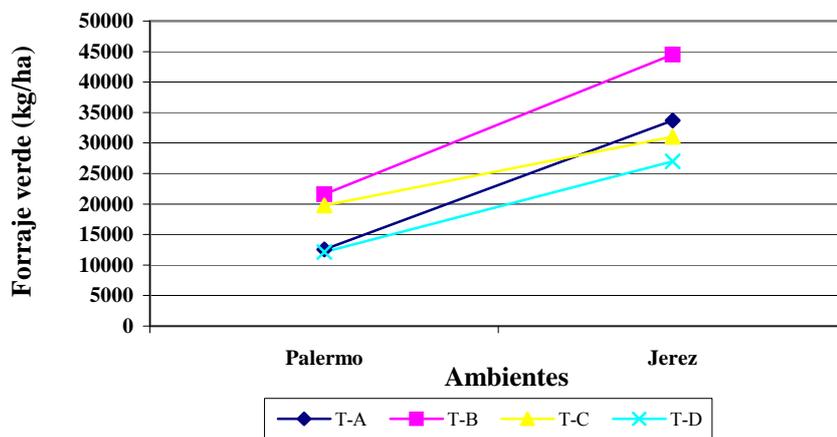


**Figura 7: Comportamiento de los genotipos de *H. coronarium* y valores medios del rendimiento de materia seca (RMS) (kg/ha) en los dos ambientes estudiados.**

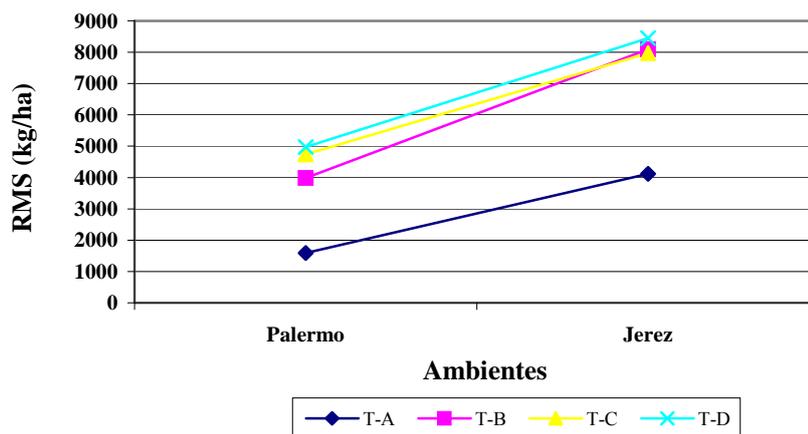
La interacción tratamientos x ambiente resultó altamente significativa y también fue de tipo cualitativo porque los diferentes tratamientos (fechas de siega) cambiaron su orden de jerarquía a través de los ambientes (Figura 8 y 9). En la producción de forraje verde, los tratamientos B y D tuvieron un comportamiento estable al pasar de Palermo a Jerez y los demás se comportaron de forma diferente en los dos ambientes. Para el rendimiento de materia seca (RMS) los tratamientos A y D fueron los que mostraron una respuesta estable, comportándose de forma diferenciada los restantes.

El tratamiento que obtuvo una mayor producción de forraje verde para la localidad de Jerez fue el B, seguido del A y C que fueron estadísticamente diferentes al anterior y el tratamiento D fue el de menor producción. En cambio, para el RMS los tratamientos D, B y C obtuvieron un mayor rendimiento y fueron estadísticamente similares, mostrando el tratamiento A la menor producción.

En la localidad de Palermo los tratamientos que obtuvieron una mayor producción de forraje verde fueron algo diferentes a los identificados en la localidad de Jerez. Los tratamientos B y C fueron los de mayor producción y el A y D los de menor. Para el RMS sólo el tratamiento D formó el grupo de mayor rendimiento y el A el de menor.



**Figura 8: Medias de la producción de forraje verde (kg/ha) de Palermo y Jerez en cada tratamiento del cultivo.**



**Figura 9: Medias del RMS (kg/ha) de Palermo y Jerez en cada tratamiento del cultivo.**

El análisis de la varianza realizado por separado para la localidad de Jerez y Palermo, mostró la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre genotipos y tratamientos para la producción de forraje verde y RMS. También se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la interacción genotipo x tratamiento para las dos parámetros evaluados (Tablas 8-11), indicando una respuesta diferente de cada genotipo según el tratamiento. Por ello, se calculó la producción media de cada genotipo para las diferentes fechas de siega.

**Tablas 8: Resultados del análisis de la varianza para la producción de forraje verde considerando la localidad de Jerez**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados* $10^{-7}$	Cuadrados medios* $10^{-6}$
Bloques (B)	2	9,81	49,05*
Tratamientos (T)	3	301,9	1.006***
Error BxT	6	4,39	7,31
Genotipos (G)	5	253,3	50,65***
TxG	15	72,08	48,06**
Error BxTxG	40	68,15	17,04
Total	71	709,6	
CV (BxT)		7,94	
CV (BxTxG)		12,12	

**Tabla 9: Resultados del análisis de la varianza para el rendimiento de la materia seca (RMS) considerando la localidad de Jerez**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados*10 <sup>-6</sup>	Cuadrados medios*10 <sup>-5</sup>
Bloques (B)	2	2,72	13,62ns
Tratamientos (T)	3	224	746,8***
Error BxT	6	2,74	4,56124
Genotipos (G)	5	104,3	208,7***
TxG	15	45,86	30,57*
Error BxTxG	40	55,36	13,84
Total	71	435,1	
CV (BxT)		20,93	
CV (BxTxG)		9,72	

**Tablas 10: Resultados del análisis de la varianza para la producción de forraje verde considerando la localidad de Palermo**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados*10 <sup>-7</sup>	Cuadrados medios*10 <sup>-6</sup>
Bloques (B)	2	5,49	27,43ns
Tratamientos (T)	3	128,5	428,2***
Error BxT	6	6,35	10,57
Genotipos (G)	5	38,99	77,9***
TxG	15	33,52	22,35***
Error BxTxG	40	16,71	4,18
Total	71	229,5	
CV (BxT)		19,7	
CV (BxTxG)		12,38	

**Tabla 11: Resultados de análisis de la varianza para el rendimiento de la materia seca (RMS) considerando la localidad de Palermo**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados*10 <sup>-6</sup>	Cuadrados medios*10 <sup>-5</sup>
Bloques (B)	2	3,03	15,13ns
Tratamientos (T)	3	129	430,3***
Error BxT	6	3,84	6,40
Genotipos (G)	5	19,26	38,52***
TxG	15	9,92	6,61***
Error BxTxG	40	5,52	1,38
Total	71	170,6	
CV (BxT)		20,93	
CV (BxTxG)		9,72	

Las Figuras del 10 al 13 muestran las interacciones genotipo x tratamiento para la producción de forraje verde (kg/ha) y RMS (kg/ha) en los dos ambientes incluidos en este estudio, siendo en todos los casos de tipo cualitativo.

En la localidad de Jerez, se observa un aumento de la producción de forraje verde del tratamiento A al B, en todos los genotipos excepto en el *Hc-11* que disminuyó. También todos se comportaron de forma estable menos el Grimaldi *cv.* y *Hc-11*, que mostraron una respuesta diferenciada. Todos los genotipos disminuyeron sus rendimientos del tratamiento B al C, mostrando Grimaldi como en el caso anterior una respuesta diferente y del tratamiento C al D también se obtuvo una disminución de la producción, pero de forma menos acusada siendo en este caso el genotipo Córdoba el que mostró un comportamiento diferente. El RMS también aumentó del tratamiento A al B, y todos los genotipos tuvieron una respuesta diferenciada, excepto el agroecotipo Gangi. Del tratamiento B al C el rendimiento fue prácticamente similar en todos, excepto en la línea Córdoba que disminuyó y los genotipos Carmen, S. Omero y Gangi se mostraron de forma estable. Del tratamiento C al D algunos genotipos tuvieron su mayor RMS, otros mantuvieron la misma producción y algunos la disminuyeron, mostraron todos una respuesta estable, excepto Córdoba y Gangi.

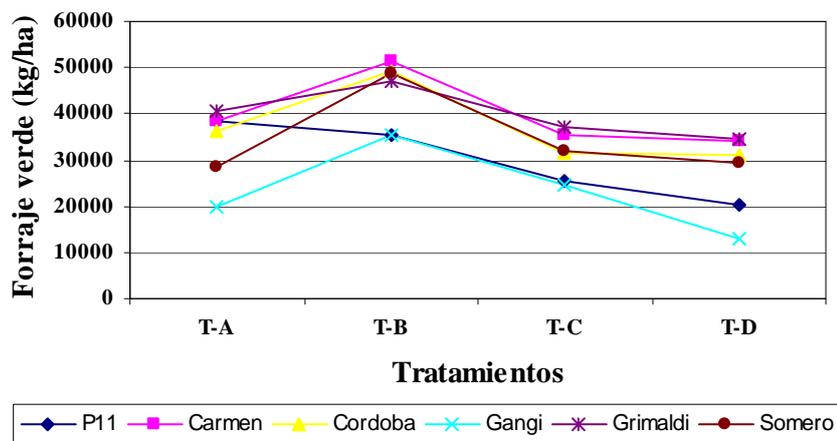
Por otra parte, los genotipos que tuvieron una mayor y menor producción de forraje verde por cada tratamiento son los mostrados a continuación:

- Tratamiento A: Grimaldi mayor producción y Gangi menor.
- Tratamiento B: Carmen mayor producción y *Hc-11* y Gangi menor
- Tratamiento C: Grimaldi mayor producción y Gangi menor

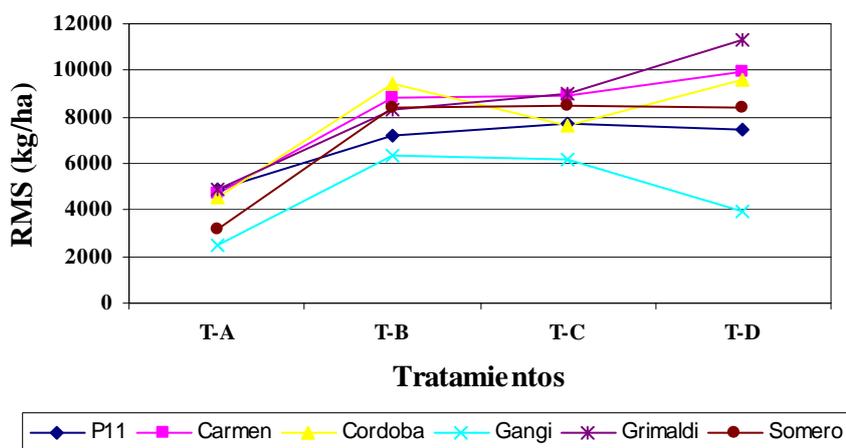
- Tratamiento D: Grimaldi y Carmen mayor producción y Gangi menor

Y para el RMS, fueron los siguientes:

- Tratamiento A: Grimaldi, Carmen y *Hc-11* mayor producción y Gangi menor.
- Tratamiento B: Córdoba mayor producción y Gangi menor
- Tratamiento C: Grimaldi y Carmen mayor producción y Gangi menor
- Tratamiento D: Grimaldi mayor producción y Gangi menor



**Figura 10: Comportamiento de los genotipos de *H. coronarium* y valores medios de la producción de forraje verde (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Jerez.**



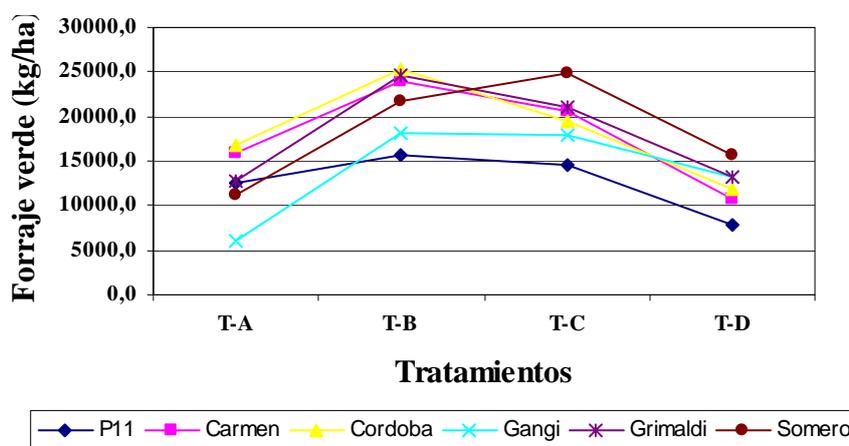
**Figura 11: Comportamiento de los genotipos de *H. coronarium* y valores medios del RMS (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Jerez.**

En la localidad de Palermo, del tratamiento A al B se obtuvo un aumento de la producción de forraje verde en todos los genotipos y la línea Córdoba tuvo una respuesta estable, siendo en todos los demás de forma diferenciada. Posteriormente, se observó una menor producción en todos los genotipos, excepto en S. Omero que aumentó. Grimaldi, Gangi y *Hc-11* se comportaron establemente, y los demás de forma diferenciada. Del tratamiento C al D disminuyó, de forma más acentuada la producción, mostrando S. Omero, Grimaldi y *Hc-11* una respuesta estable. Por otra parte, también se observó un aumento del RMS del tratamiento A al B, teniendo todos los genotipos una respuesta estable excepto S. Omero y *Hc-11*. Del tratamiento B al C continuó aumentando la producción y en este caso todos los genotipos tuvieron una respuesta diferenciada. Por último, del tratamiento C al D, el RMS se mantuvo constante en algunos genotipos y en otros no, como en *Hc-11* que disminuyó su producción y en Gangi aumentó, mostrando en ambos casos un comportamiento diferenciado.

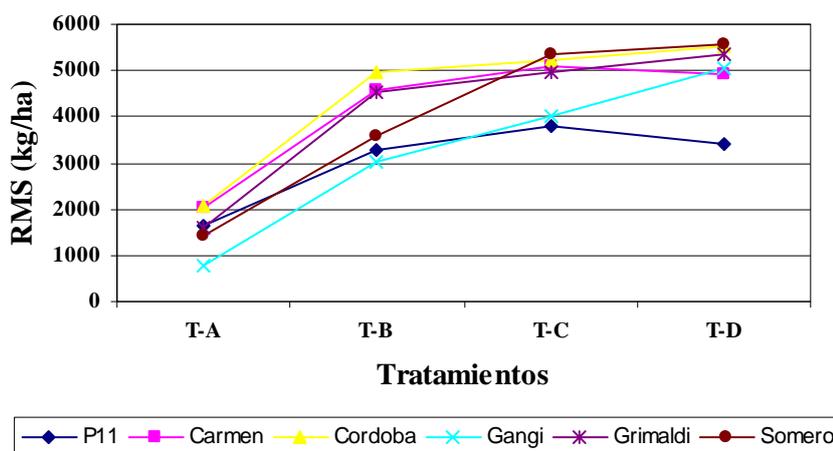
Los genotipos que tuvieron una mayor y menor producción de forraje verde por cada tratamiento fueron:

- Tratamiento A: Córdoba mayor producción y Gangi menor.
- Tratamiento B: Córdoba mayor producción y *Hc-11* menor
- Tratamiento C: S. Omero mayor producción y *Hc-11* menor
- Tratamiento D: S. Omero mayor producción y *Hc-11* menor

Para el RMS se obtuvieron resultados similares, pero en el tratamiento A el cultivar Carmen mostró una producción similar a la línea Córdoba.



**Figura 12: Comportamiento de los genotipos de *H. coronarium* y valores medios de la producción de forraje verde (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Palermo.**



**Figura 13:** Comportamiento de los genotipos de *H. coronarium* y valores medios del RMS (kg/ha) para los distintos tratamientos en la localidad de Palermo.

#### 4. DISCUSIÓN

Los primeros trabajos en los cuales se estudia con método experimental en Andalucía el potencial agronómico de este cultivo corresponden a los realizados por Karlovsky *et al.* (1971) y Ratera *et al.* (1976). En sus trabajos se exponen los resultados obtenidos en ensayos realizados en la provincia de Cádiz (Tarifa), con rendimientos medios de 6.500 kg/ha de MS en zullares de tres años.

Anteriores a estos trabajos, distintos ensayos demostrativos recogidos en la obra “La zulla: la reina de las forrajeras de secano” ya ponían de manifiesto su alto potencial productivo (Anónimo, 1907).

En nuestro estudio, los valores medios obtenidos para la producción de forraje verde estuvieron en torno a los 29.000 kg/ha y 3.000 kg/ha para el RMS, siendo estos rendimientos menores a los indicados anteriormente, posiblemente por corresponder al primer ciclo del cultivo. Resultados similares fueron obtenidos por Ruisi *et al.* (2010) evaluando la producción de 36 poblaciones naturales de Sicilia y Annicchiarico *et al.* (2008), con valores medios de 4.000 kg/ha de MS. Por otra parte, Montes (1994) en un ensayo realizado en Jerez, obtuvo en el primer año del cultivo, una producción de 18.500 kg/ha de forraje verde y 2.771 kg MS/ha. El RMS resultó ser similar al obtenido en nuestro estudio, pero la producción de forraje verde fue muy inferior en torno a los 10.500 kg/ha, hecho posiblemente debido a una fecha de siega más tardía. La media de proteína sobre MS estuvo entorno a los 700 kg/ha, siendo similar a la obtenida por Ruisi *et al.* (2010).

En el segundo año del cultivo, los parámetros evaluados aumentaron, pasando a obtener 37.537 kg/ha de forraje verde, 3.819,6 kg/ha de RMS y 821,22 kg/ha de PMS, produciéndose un aumento aproximadamente del 22,5, 24 y 16 % respectivamente, con respecto al primer año. Montes (1994) obtuvo unos rendimientos de 28.487 kg de forraje verde/ha y 6.352 kg MS/ha para dos cortes que comparados con los obtenidos en nuestro ensayo, el RMS fue el 66% superior y la producción de forraje verde fue inferior y similar a la obtenida en nuestro primer año. El mayor rendimiento de MS pudo estar condicionado por un mayor número de cortes (2). Lombardi *et al.* (2000) evaluando dos cultivares italianos y dos ecotipos en la Toscana (Italia) obtuvieron resultados similares a los nuestros, mostrando una media de 3.500 kg de MS/ha.

Al comparar los rendimientos de los diferentes genotipos se obtuvieron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados en el primer año del cultivo. Cuando observamos que un genotipo resulta de mayor rendimiento comparado con los demás para la producción de forraje verde, no podemos olvidar su rendimiento de materia seca por hectárea y su producción de proteína por hectárea, puesto que son los parámetros que determinan el precio del forraje, es decir nos van a pagar por kg de MS y por kg de proteína. A la vista de nuestros resultados el “Del País” *cv.* fue estadísticamente superior para la producción de forraje verde, sin embargo para RMS compartió liderazgo con otras líneas, mostrando una respuesta similar para el contenido en proteína. Basándonos en esto, el ecotipo *Hc-14* fue el de mayor rendimiento tanto para MS como para contenido en proteína y aunque no obtuvo la mayor producción de forraje verde, si ocupó una de las primeras posiciones. Por lo tanto, este genotipo fue el que presentó un mayor potencial forrajero el año de establecimiento del cultivo. En el otro extremo estaría el cultivar *Hc-13* que para todos los parámetros determinados fue el de menor producción y calidad.

En el segundo ciclo del cultivo el análisis no estableció diferencias entre los genotipos, siendo estadísticamente todos similares para la producción de forraje verde y RMS. Sin embargo, cuando se observan las producciones de cada uno, los genotipos mantienen las mismas tendencias, es decir, los de mayor rendimiento en el primer año siguieron siendo uno de los mejores en el segundo año, y así para los de menor producción, como fue el caso de *Hc-13*. Por otra parte, en este segundo año se obtuvieron CV superiores al año anterior, indicando un error experimental superior y resultados menos fiables. Además, la MDS también fue muy elevada de 12.908 kg/ha para la producción de forraje verde y de 1.496,5 kg/ha para el RMS. Todo esto sugiere la necesidad de reducir este CV para mejorar la precisión de nuestro experimento, siendo una de las alternativas aumentar el número de repeticiones. Ciertas especies tienen naturalmente más variabilidad que otras y, para la misma precisión, se necesitan menos repeticiones en especies con menor variabilidad que en las de mayor (Steel y Torrie, 1988).

Otra manera de controlar el error experimental, sería mediante unidades experimentales de mayor tamaño puesto que presentan menos variación que las pequeñas. Sin embargo, un aumento en el tamaño de la unidad experimental trae a menudo como consecuencia una reducción en el número de repeticiones que pueden tenerse, debido a lo limitado del material experimental del que se suele disponer en un experimento dado. Generalmente es más útil lograr una repetición adecuada de parcelas pequeñas que de parcelas grandes (Steel y Torrie, 1988). En nuestro caso, *H. coronarium* presenta una gran variabilidad intra e interpoblacional y según los resultados obtenidos se podría sugerir para este cultivo el uso de diseños experimentales que incluyeran más de tres repeticiones como en el caso de otra leguminosa, *Vigna unguiculata* (caupí) que según Escobar *et al.* (1990) el número de repeticiones necesarias para lograr un coeficiente de variación aceptable y una precisión razonable se estima en 4.

Para el contenido de proteína sobre MS el análisis sí estableció diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos en el segundo año del cultivo. El C.V. obtenido fue prácticamente similar al del primer año y la M.D.S. fue elevada como en los otros dos parámetros evaluados. El ecotipo *Hc-13* tuvo un comportamiento similar en los dos años, siendo el de menor contenido de proteína. En cambio, los genotipos que en el primer año mostraron un mayor contenido de proteína (*Hc-14* y *Hc-9*), disminuyeron en el segundo año, pasando *Hc-6* y Córdoba a obtener los mayores valores junto a la mayor producción de forraje verde y RMS.

Por otra parte, los resultados obtenidos para comprobar la homogeneidad inicial de cada genotipo, mostraron diferencias estadísticamente significativas para las plantas nacidas de semilla y las plantas procedentes de rebrote. Observando los diferentes genotipos podemos deducir que no supone una ventaja frente a estos caracteres usar materiales comerciales como parentales, puesto que tanto un caso como en otro encontramos ecotipos con rendimientos superiores.

Las correlaciones entre los parámetros evaluados resultaron ser muy elevadas, hecho que era de esperar, puesto que al existir más número de plantas nacidas de semilla y procedentes de rebrotes en un área determinada, mayor es la producción de forraje.

Aunque del análisis de los resultados del cultivo de la zulla, correspondiente a dos campañas agrícolas, no permite establecer conclusiones determinantes, parece desprenderse de nuestro estudio, que algunas de las líneas evaluadas podrán ser recomendadas y aprovechadas directamente por sus producciones en la localidad de Jerez, como la *Hc-14* y *Hc-9* para el primer año del cultivo y la *Hc-6* y Córdoba para el segundo año. Por otra parte, habrá líneas que no serán adecuadas para ser incluidas en futuros programas de mejora como parentales donadores de “alto rendimiento”, como es el caso de la *Hc-13*, y otras que *a priori* se deberán incluir como futuros parentales.

En el segundo ensayo evaluamos la producción de forraje verde y RMS en varios genotipos de *H. coronarium* sometidos a diferentes regímenes de aprovechamiento (fechas de siega) en dos ambientes contrastantes. En este estudio el objetivo fue identificar la fecha de siega adecuada para obtener un mayor rendimiento.

Los resultados mostraron diferencias significativas para ambientes, genotipos, tratamientos y la interacción entre ellos. La alta significación encontrada en la interacción G x E, pone de manifiesto que los ambientes tuvieron un efecto sobre los genotipos y que estos respondieron de manera diferente en ellos. Esto demuestra que las condiciones ambientales generadas en cada localidad, son determinantes para las producciones y por lo tanto se recomendaran unas líneas u otras dependiendo de la localidad. Para el rendimiento de forraje verde, en ambas localidades el cultivar Carmen fue el de mayor rendimiento. Sin embargo, en la localidad de Jerez éste fue estadísticamente similar al Grimaldi *cv.* y a la línea Córdoba y en la localidad de Palermo a los genotipos anteriormente indicados y a S. Omero *cv.* En la evaluación del RMS, la línea Córdoba junto con las variedades comerciales volvió a ser uno de los mejores genotipos en ambas localidades. En los últimos años, se está reconociendo la importancia que tiene la adaptación específica de las variedades (Almekinders, 2001; Ortiz, 2003). Cecarelli y Grando (2000), han puesto de manifiesto que seleccionar directamente en los ambientes de destino permite que los nuevos cultivares se adapten mejor al ambiente biofísico. Este nuevo enfoque de la mejora genética de cultivos, nos lleva a recomendar a la línea Córdoba como uno de los mejores genotipos para ser cultivados en Jerez, por ser uno de los que tuvo mayor rendimiento y además por su mejor adaptación a esta localidad puesto que fue seleccionada para esta. De estos resultados también se puede deducir su buen comportamiento forrajero en la localidad de Palermo, pudiendo ser considerada uno de los genotipos a incluir en esta localidad.

La interacción T x E también resultó ser significativa, indicándonos que el régimen de aprovechamiento (fecha de siega) recomendado para obtener el mayor rendimiento será diferente en Jerez y Palermo. En ambas localidades el corte realizado a mediados de mayo (tratamiento B) fue con el que se obtuvo una mayor producción de forraje verde y por lo tanto el sugerido, aunque en Palermo el tratamiento C fue estadísticamente similar al B, y también podría ser una opción para esta localidad.

Bustamante *et al.* (2003) determinaron que el contenido de MS en zulla se incrementaba al aumentar el grado de madurez. Nuestros resultados también mostraron un aumento del RMS a medida que la fecha de siega fue más tardía en ambas localidades. En Jerez, aunque el corte realizado

a mediados de junio (tratamiento D) fue con el que se obtuvo un mayor rendimiento y por lo tanto el idóneo para esta localidad, los tratamientos B y C resultaron ser estadísticamente similares al anterior, siendo otras dos alternativas. En Palermo, se obtuvieron unos resultados parecidos, siendo el tratamiento D el recomendado para este ambiente. Para ambas localidades, el corte realizado a finales de abril (tratamiento A) no sería el recomendado porque fue con el que se obtuvo un menor rendimiento.

A su vez en cada localidad, se determinó la existencia de interacción genotipo tratamiento sugiriéndonos estos resultados que según el genotipo que utilicemos tendremos que aplicar un régimen de aprovechamiento u otro para maximizar sus rendimientos. Por esto, se deberá de recomendar una fecha de siega para cada genotipo.

En Jerez, para obtener la mayor producción de forraje verde, el régimen de aprovechamiento recomendado para todos los genotipos incluidos en este estudio fue el tratamiento B, excepto para la línea Córdoba donde la fecha de siega idónea sería a mediados de abril (tratamiento A). El régimen de aprovechamiento sugerido para obtener los mayores RMS en los cultivares Carmen y Grimaldi y en la línea Córdoba sería a mediados de junio (tratamiento D), para la variedad S. Omero se podrían establecer los tratamientos B o C, para el agroecotipo Gangi el tratamiento B y por último para *Hc-II* el tratamiento C. Las diferentes respuestas de los genotipos a los regímenes de aprovechamiento podrían ser debido a ciclos de floración más largos o cortos. Por ejemplo, el Carmen *cv.* y Grimaldi *cv.* como se mostró en el Capítulo I de esta Tesis fueron unos de los genotipos más tardíos en floración, teniendo un periodo de crecimiento mayor y estableciendo su período de aprovechamiento apto a finales de la primavera.

En Palermo, todos genotipos tuvieron una respuesta similar para la producción de forraje verde, excepto el S. Omero *cv.* El tratamiento recomendado fue el B ya que obtuvieron su mayor rendimiento, menos para S. Omero *cv.* que tuvo una mayor producción en el corte realizado a finales de mayo (tratamiento C). Para obtener el mayor RMS los resultados mostraron que la fecha de siega idónea sería a mediados de junio (tratamiento D) para los genotipos Córdoba, Gangi, Grimaldi y S. Omero y a finales de mayo (tratamiento C) para Carmen *cv.* y *Hc-II*.

Aunque del análisis de los resultados de sólo un año no cabe aventurar conclusiones concretas, con este estudio aportamos una valiosa información sobre qué genotipos podrían responder mejor a las condiciones ambientales ensayadas y el régimen de aprovechamiento idóneo para cada localidad y cada genotipo estudiado.

## 5. REFERENCIAS

- Almekinders, C., 2001. Científicos y agricultores logrando variedades mejores. Memorias del Programa Colaborativo de Fitomejoramiento Participativo en Mesoamérica., fondo Noruego de Desarrollo y CIPRES. (Ed.) Managua Nicaragua. pp 5-14.
- Annichiarico, P., Abdelguerfi, A., Ben Younes, M., Bouzerzour, H., Carroni, A.M., 2008. Adaptation of sulla cultivars to contrasting Mediterranean environments. Aust J Agric Res., 59: 702–706.
- Anónimo, 1907. La Zulla la reina de las forrajeras de secano. Biblioteca Agraria Solariana. Sevilla.
- Bustamante, J., Allés, A., Espadas, M., Muñoz, J., 2003. Valoración bromatológica de la zulla de 1er año. Boletín de Información Técnica. Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Mahón (Menorca). N° 44.
- Cecarelli, S., Grando, S., 2000. Fitomejoramiento participativo descentralizado. LEISA. Boletín de ILESA. Semillas para la agrodiversidad. 15(3-4): 35-36.
- De Lacy, I., Basford, K.E., Cooper, M., Bull, J.K., McLaren, C.G., 1996. Analysis of multi-environment trials -An historical perspective. Of the book plant adaptation and crop improvement. (Eds.) Cooper, M., Hammer, G.L. CAB International in association with International Rice Research Institute and the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Australia. pp 39-114.
- Emberger, L., 1955. Une classification bioclimatique des climats. Rec. Trav. Fac. Sc. Montpellier, série bot., 7 : 3-45.
- Escobar, C., Buitrago, I.J., Jaramillo, J.I., 1990. Tamaño de parcela experimental y número de repeticiones para ensayos de rendimiento con caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp). Rev. Fac. Nac. De Agron., 43(1-2): 73-91.
- Karlovsky, J., Ratera, C., Ruíz, J.A., Ambel, E., 1971. Estudio de las necesidades nutritivas de las praderas espontáneas y mejoradas. Agencia de Desarrollo Ganadero. Ministerio de Agricultura. Madrid. Boletín nº 2.
- Lombardi, P., Argenti, G., Sabatini, S., Pardini, A., 2000. Productive and ecophysiological characteristics of some varieties of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in a Mediterranean area of Tuscany. CIHEAM- Options Mediterraneennes. pp 281-285.
- MARM, 2009. Anuario de Estadística. Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística. Madrid.
- Montes, T., 1994. La zulla. Nuevas áreas de cultivo, su problemática. Revista da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens. 14/15: 173-187.
- Ortiz, R., Rios, H., Ponce, M., Verde, G., Acosta, R., Miranda, S., Martín, L., Moreno, L., Martínez, M., Valera, M., 2003. Efectividad de la experimentación campesina en la microlocalización de variedades de frijol y la evaluación de la interacción fenotipo-ambiente. Cultivos tropicales, 24 (4).
- Ratera, C., Muslera, E., Ruiz Cornejo, J.A., Ambel, E., 1976. Comunicación. Potencial y necesidades nutritivas de las praderas en varios suelos de Sureste español. ASPA: Boletín informativo de la Asociación de Productividad Agraria, 134: 90-97.

Ruisi, P., Siragusa, M., Di Giorgio, G., Graziano, D., Amato, G., Carimi, F., Giambalvo, D., 2010. Pheno-morphological, agronomic and genetic diversity among natural populations of *Hedysarum coronarium* L. collected in Sicily, Italy. *Genet Resour Crop Evol.*, 58(2): 245-257.

Steel, R., Torrie, J., 1988. Principios de diseño experimental. En: *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª edición. México: McGrawHill. pp 119-131.

## CAPÍTULO III

---

Estudios preliminares de la susceptibilidad de *Hedysarum coronarium* L. a *Orobanche crenata* Forsk



## 1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo II se puso de manifiesto el potencial productivo que *Hedysarum coronarium* L. (zulla) tiene como cultivo forrajero en condiciones de secano andaluz.

Pero lo mismo que sucede con otras leguminosas, podría ser atacada por la planta parásita *Orobanche crenata* (jopo) que representa una de las mayores limitaciones al cultivo de leguminosas en distintas zonas del área Mediterránea.

En condiciones de campo se constató y se informó a la comunidad científica (Córdoba *et al.*, 2008) que *H. coronarium* podría ser una especie hospedante de *O. crenata* y se planteó la cuestión si este tipo de infección podría convertirse en un limitante para su cultivo, como lo ha sido en habas (Cubero y Moreno, 1979), guisantes (Rubiales *et al.*, 2003), arvejones (Nadal *et al.*, 2007) y almortas (Sillero *et al.*, 2005).

Por ello, se planteó un estudio preliminar para evaluar la susceptibilidad a *O. crenata* en *H. coronarium*. Para llevar a cabo este objetivo se realizaron dos ensayos: en el primer ensayo, se evaluaron 7 genotipos de *H. coronarium*, y en el segundo se incluyeron algunos genotipos del ensayo anterior y otros diferentes, entre ellos *Hc-3* y *Hc-26* que fueron utilizados para desarrollar un programa de mejora en la especie. Debido a la baja inducción de la germinación de semillas de jopo por las raíces de zulla, se realizó un tercer ensayo para descartar la posibilidad de que ésta germinación fuera espontánea, y por lo tanto, independiente de la planta hospedadora.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Para el primer ensayo se emplearon 7 entradas de *H. coronarium* procedentes de nuestra colección de trabajo y una línea control de *Vicia narbonensis* de alta susceptibilidad conocida (Vn-270). Estos genotipos se seleccionaron a partir de un trabajo anterior (datos no publicados) con objeto de estudiar la validez de la metodología desarrollada por Pérez de Luque *et al.* (2004) para estudiar la susceptibilidad/resistencia a *O. crenata*.

En un segundo experimento se incluyeron las entradas *Hc-25*, *Hc-30*, *Hc-31*, *Hc-33* y *Hc-34* y *Hc-3* y *Hc-26*, por presentar valores mayores de germinación (mayor proporción de semillas blandas). Además, el estudiar su comportamiento ante esta planta parásita fue de interés ya que estos genotipos

fueron seleccionados como veremos en el Capítulo VI, como parentales para el desarrollo de una nueva población.

Por último, para el tercer experimento se utilizó la entrada Hc-25, por ser una de las que indujo mayor germinación de semillas de jopo en los ensayos anteriores

Las semillas de *O. crenata* utilizadas en los ensayos fueron recogidas en la Finca Alameda del Obispo de Córdoba en el año 2006 sobre jopos desarrollados en plantas de *Vicia faba*.

## **2.2. Prueba de viabilidad de las semillas de jopo**

Antes de comenzar los ensayos de germinación se estimó el porcentaje de viabilidad de las semillas de jopo mediante la prueba de tetrazolio (Smith, 1951; Aalders y Pieters, 1985; Lopez y García, 2000). Dicho test consistió en añadir una solución de TTC (2, 3, 5-cloruro de trifeniltetrazolio) al 1 % a aproximadamente 70 mg de semillas de jopo hasta cubrir las. Las semillas se mantuvieron 72 horas a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, la solución de TTC se extrajo con una jeringa y las semillas se sumergieron durante 10 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 10 % para decolorar la cubierta seminal. Una vez decoloradas, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada. Finalmente, se observaron bajo microscopio binocular y se determinó el número de semillas viables caracterizadas por presentar un color rojo-anaranjado.

## **2.3. Desinfección de las semillas de *H. coronarium* y *O. crenata***

Las semillas de zulla fueron esterilizadas en 3,5 % de hipoclorito sódico durante 10 minutos y luego lavadas tres veces con agua destilada estéril. Por otra parte, la desinfección de las semillas de *O. crenata* se realizó con una solución de hipoclorito sódico al 3,5 % con Tween20 al 0,1 %. Para un mejor manejo de éstas se introdujeron en bolsitas para infusiones. Las bolsas, con las semillas en su interior se sumergieron en esta solución durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo las semillas fueron aclaradas tres veces con agua destilada estéril (González-Verdejo *et al.*, 2005).

## **2.4. Acondicionamiento de las semillas de jopo.**

Antes de la inoculación, éstas fueron sometidas a un periodo de acondicionamiento en el cual absorben agua y adquieren así la hidratación necesaria para su germinación. Para ello se tomaron 8 mg de semillas (aproximadamente 2.500 semillas) previamente desinfectadas y se depositaron en placas petri de 12x12 cm cubiertas con un papel de fibra de vidrio GF/A (Whatman) autoclavado, del mismo

tamaño que la placa y se les añadió agua. El papel de fibra de vidrio previene la proliferación de microorganismos. Las placas petri se sellaron con parafilm, se cubrieron con papel de aluminio y se mantuvieron a 20-25 °C durante 10 días.

## **2.5. Metodología**

El ensayo se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Pérez de Luque *et al.* (2004). Las semillas de zulla fueron pregerminadas durante 17 días, en placas petri con papel de filtro humedecido y en oscuridad, a 20-25 °C. Cuando la raíz alcanzó un tamaño de 4-5 cm, se colocaron en las placas petri con perlita y papel de fibra de vidrio, sobre el que se habían extendido las semillas de *O. crenata*. A las placas se les realizó un orificio en la parte superior para permitir el crecimiento libre de la parte aérea de la planta y se envolvieron en papel de aluminio para evitar que la luz incidiera sobre las raíces y semillas de jopo. Se regaron con solución nutritiva Hoagland y se almacenaron verticalmente en una cámara de cultivo a 21 °C con 16 h de fotoperiodo. Se colocaron cinco placas independientes para cada genotipo de *H. coronarium*.

Las observaciones realizadas comenzaron a los 21 días tras la inoculación, contando el número de semillas de jopo germinadas que establecieron contacto con la raíz y determinando la longitud de la raíz (cm). A los 28 días se repitió la misma observación y los nódulos formados se determinaron a los 44 días. Los parámetros que se obtuvieron a partir de las mediciones fueron los siguientes:

- Porcentaje de germinación: en cada placa se realizó un conteo de 300 semillas de jopo situadas a menos de 3 mm de la raíz de la planta de zulla, anotando el número de semillas germinadas. Este dato se expresó después en tanto por ciento.
- Longitud de la raíz: se llevó a cabo una estimación por el método desarrollado por Tennat (1975).
- Nódulos por cm de raíz: el total de nódulos por planta se dividió por la longitud de la raíz en cm.

El segundo experimento se realizó siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero con ligeras modificaciones.

En este nuevo ensayo se utilizaron 6 placas independientes de cada línea, para tener un mayor número de repeticiones y obtener unos datos más consistentes. Las semillas se escarificaron para favorecer la germinación y posteriormente se desinfectaron con hipoclorito sódico al 3,5 %. A los 4 días de la germinación se llevaron a contenedores con sustrato de perlita y allí se mantuvieron hasta que fueron colocadas en las placas petri, previamente inoculadas con las semillas acondicionadas de jopo. La

determinación de la germinación y de la nodulación se realizó en los mismos tiempos descritos que en el ensayo anterior.

En los dos experimentos anteriores, la inducción de la germinación de las semillas de jopo por las raíces de zulla fue muy baja. Para descartar la posibilidad de que esta germinación fuera espontánea, y por lo tanto, independiente de la planta hospedadora, se planteó un tercer experimento. Para ello, se colocaron 6 placas diferentes para cada una de las siguientes situaciones: (1) placas con plantas de zulla inoculadas, (2) placas con semillas de jopo en ausencia de la planta hospedadora y (3) placas con plantas de zulla inoculadas a las que se les añadió un estimulante artificial de la germinación GR24 (34  $\mu$ M). La solución de GR24 se hizo según el procedimiento descrito por Van Hezewijk *et al.* (1993). En todos los casos se hizo un conteo de 300 semillas de jopo, anotando el número de semillas germinadas a los 15 y 28 días.

Se realizaron análisis de la varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Antes de realizar el análisis de la varianza se comprobó la normalización y la homogenización de las variables. Los datos de porcentaje se transformaron por la fórmula de arcoseno (Little y Hills, 1989), donde x es el porcentaje de germinación:

$$Y = \arcsen\sqrt{(x/100)}$$

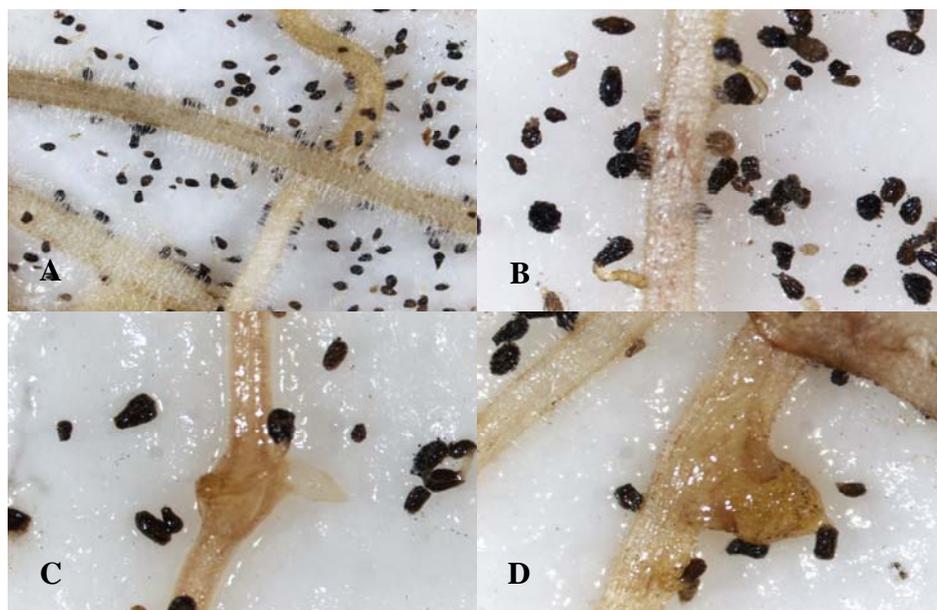
### 3. RESULTADOS

La viabilidad de las semillas de *O. crenata* se determinó mediante el test de tetrazolio, el cual detecta la actividad respiratoria en los tejidos vivos mediante la transformación de las sales de tetrazolium en formazán que confiere un color rojizo. Los resultados obtenidos del test de viabilidad mostraron valores superiores al 90 %.

En todos los parámetros estudiados se encontraron diferencias genotípicas (Tabla 1). En cuanto a la inducción de la germinación de semillas de *O. crenata*, las entradas *Hc-29*, *Hc-30* y *Hc-34* no indujeron germinación, mientras que *Hc-33* mostró el máximo valor con una media del 3 %. Al considerar la germinación a los 28 días después de la inoculación, los valores aumentaron en casi todos los casos, salvo *Hc-30*, *Hc-31* y *Hc-34* que mantuvieron los mismos valores. De nuevo la *Hc-30* y *Hc-34* no

indujeron la germinación de semillas de jopo, mientras *Hc-25*, *Hc-33* y Carmen presentaron los mayores valores de 4,6, 4 y 5,5 % respectivamente.

Solamente una proporción muy baja (2,7-10 %) de las semillas germinadas lograron establecerse con éxito en la raíz del huésped y formar un nódulo, siendo *Hc-33* la línea que presentó un mayor valor de este índice (10 %), seguida de la variedad Carmen (2,7 %). El sistema de placas petri empleado fue satisfactorio, con un total de 55 instalaciones de jopo en el testigo susceptible de *V. narbonensis*. Todas las líneas presentaron un número significativamente más bajo de nódulos que el testigo, correspondiendo los menores valores a *Hc-25*, *Hc-29*, *Hc-30*, *Hc-31* y *Hc-34*, que no mostraron ningún tipo de infección. Resultados similares fueron obtenidos al considerar el número de nódulos por unidad de longitud de raíz. La longitud de las raíces de las plantas de zulla se situó entre los 8 y 18 cm, siendo significativamente inferiores a la obtenida en *V. narbonensis* (181,4 cm).



**Figura 1: Fases del proceso de infección de *Orobancha crenata* en *Hedysarum coronarium*. (A) Semillas germinadas de *O. crenata*. (B) Semillas germinadas de *O. crenata* en las primeras fases de infección. (C) Fases iniciales de formación del nódulo. (D) Engrosamiento de tubérculos de *O. crenata*.**

Tabla 1. Descomposición de los mecanismos de resistencia a *Orobanche crenata* en diferentes entradas de *Hedysarum coronarium* L.

Población	% Germinación semillas		% de semillas germinadas que forman nódulos	Nº Nódulos totales por planta	Long. de raíz (cm)	Nº Nódulos por cm de raíz
	21 días	28 días				
<b>Vn-270</b>	15±0,3 (a)	34,2±2,5 (a)	39,7±2,5 (a)	55 (a)	181,4±29,8 (a)	0,17 (a)
<b>Hc-25</b>	1,1±1,1 (b)	4,6±0,3 (b)	0 (c)	0 (b)	8,2±0,4 (b)	0 (b)
<b>Hc-29</b>	0 (b)	0,5±0,5 (d)	0 (c)	0 (b)	10,9±3,1 (b)	0 (b)
<b>Hc-30</b>	0 (b)	0 (d)	0 (c)	0 (b)	11,3±1,15 (b)	0 (b)
<b>Hc-31</b>	0,3±0 (b)	0,3±0 (cd)	0 (c)	0 (b)	9,4±0 (b)	0 (b)
<b>Hc-33</b>	3±1 (b)	4±1,6 (bc)	10±4,2 (b)	1 (b)	16,4±3,1 (b)	0,04 (b)
<b>Hc-34</b>	0 (b)	0 (d)	0 (c)	0 (b)	16,1±5,9 (b)	0 (b)
<b>Carmen cv.</b>	0,6±0,6 (b)	5,5±0,5 (b)	2,7± 2,7(b)	0,5 (b)	18±3,1 (b)	0,01 (b)

**Nota:** Las entradas con distinta letra son estadísticamente diferentes para  $P<0.05$  (Test de Tukey's)

En el segundo ensayo, también todas las entradas de zulla estudiadas presentaron unos porcentajes de germinación de semillas de *O. crenata* significativamente inferiores a los del testigo *V. narbonensis* (31,1 %) (Tabla 2). Algunas entradas incluidas en el ensayo anterior mostraron una mayor germinación de semillas de jopo, siendo la *Hc-25* la que presentó el máximo con una media de 2,6 %, seguida de la variedad Carmen con valores de 1,6 %. La *Hc-30* indujo el mismo número de semillas germinadas, pero la *Hc-31* no presentó germinación. De las nuevas entradas evaluadas la *Hc-3* fue una de las que indujo mayor germinación, obteniendo la *Hc-26* valores del 0 %. Los datos estimados a los 28 días después de la inoculación, mostraron un aumento del porcentaje de semillas germinadas en todas las entradas evaluadas, excepto *Hc-3* que mantuvo constante sus valores. En este caso la inducción de la germinación de semillas de jopo fue menor que en el ensayo anterior, excepto el testigo que presentó valores similares (38,3 %). Del total de las semillas que germinaron, de nuevo sólo una baja proporción fueron capaces de formar un nódulo, aunque existieron diferencias muy marcadas a este respecto entre genotipos. La *Hc-25* y la variedad Carmen aunque estadísticamente fueron similares a las demás entradas de *H. coronarium*, exhibieron un mayor número de instalaciones de jopo, siendo en este ensayo

la media menor (0,1 % en ambos casos). Para el testigo los nódulos formados fueron similares a los obtenidos en el ensayo primero y también significativamente diferentes a los genotipos de *H. coronarium*. En este experimento, las plantas de zulla mostraron un rango más amplio de longitud de raíz (12,4- 25,4 cm), siendo en este caso el rango de *V. narbonensis* menor.

**Tabla 2. Descomposición de los mecanismos de resistencia a *Orobancha crenata* en diferentes ecotipos de *Hedysarum coronarium* L.**

Población	% Germinación semillas		% semillas germinadas que forman nódulos	Nº Nódulos totales por planta	Long. de raíz (cm)	Nº Nódulos por cm de raíz
	21 días	28 días	44 días	44 días	21 días	
<b>Vn-270</b>	31,1±7,1 (a)	38,3±0 (a)	18,6± 0 (a)	56 (a)	116,22±0 (a)	0,37 (a)
<b>Hc-3</b>	1,3±1 (b)	1,3±1 (b)	-	-	-	-
<b>Hc-25</b>	2,6± 1,6 (b)	3,1±2,1 (b)	0,1±0,1 (b)	0,5 (b)	19,1±6,6 (b)	0,01 (b)
<b>Hc-26</b>	0 (b)	0 (b)	0 (b)	0 (b)	14,4±4,7 (b)	0 (b)
<b>Hc-30</b>	0 (b)	0 (b)	0 (b)	0 (b)	12,4±3,1 (b)	0 (b)
<b>Hc-31</b>	0 (b)	0,1±0,1 (b)	0,1±0,1 (b)	0,5 (b)	21,3±3,4 (b)	0,01 (b)
<b>Hc-33</b>	0,3± 0,3 (b)	0,6±0,3 (b)	0 (b)	0 (b)	22,1±4,0 (b)	0 (b)
<b>Hc-34</b>	0,6±0 (b)	3,5±0,8 (b)	0 (b)	0 (b)	25,4±3,6 (b)	0 (b)
<b>Carmen cv.</b>	1,6±1,3 (b)	2,8±1,8 (b)	0 (b)	0 (b)	29,3±6,4 (b)	0 (b)

**Nota: Las entradas con distinta letra son estadísticamente diferentes para  $P < 0.05$  (Test de Tukey's)**

Como los resultados obtenidos mostraron niveles de germinación de semillas de jopo bajos, planteamos otro ensayo para evaluar si esta germinación era debida a una germinación espontánea de las semillas de *O. crenata*, o bien era inducida por las plantas de zulla.

Los resultados obtenidos mostraron que no existía germinación de semillas de jopo cuando éstas estaban solamente hidratadas (Tabla 3). Por el contrario, cuando estaba presente la planta se obtuvo un 3,5 % de germinación de semillas de *O. crenata*, y de éstas la proporción de semillas que fueron capaces de formar nódulos fue del 13,9 %. En las placas control, las semillas en presencia de GR24 presentaron una germinación de aproximadamente el 20 %.

**Tabla 3: Germinación de semillas de *Orobancha crenata* en presencia de agua (1), de la raíz de la planta hospedadora (2) y de la raíz de la planta hospedadora con GR24 como control (3).**

Situaciones	% Germinación semillas			% semillas germinadas que forman nódulos	Nº nódulos totales por planta
	15 días	28 días	44 días	44 días	
1	0	0	-	-	
2	0	3,5±1,2	13,9±8,9	1,7±1	
3	19,52±4,1	21,7±4,1	16,1±10,8	7,7±4,4	

**Nota: Los valores fueron estimados tras la inoculación.**

#### 4. DISCUSIÓN

En este estudio se pone de manifiesto que la inducción de la germinación de semillas de *O. crenata* por los diferentes genotipos de *H. coronarium* fue muy baja (menos del 6 %) comparado con el testigo evaluado que presentó valores del 34-38 % [resultados similares para el control *V. narbonensis* fueron obtenidos por Nadal *et al.* (2007)] (Tabla 1 y 2).

Aunque se obtuvieron bajos porcentajes de germinación, ésta no fue espontánea, sino que se debió a una señal exógena inducida por la planta hospedadora (Tabla 3). La menor germinación puede deberse a una menor secreción de estimulantes por las plantas (estrigolactonas) que tiene como consecuencia una baja concentración de los mismos en las cercanías de la raíz y por lo tanto una menor germinación de las semillas de jopo. Las estrigolactonas son metabolitos secundarios, recientemente clasificadas como una nueva clase de hormonas de las plantas con funciones endógenas (Gómez-Roldán *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008) y de señalización externa, siendo los estimulantes de la germinación de las plantas parásitas de los géneros *Striga* y *Orobancha* spp. (Cook *et al.*, 1966; Bouwmeester *et al.*, 2003). Por otra parte, los porcentaje de semillas germinadas que fueron capaces de formar nódulos también fueron reducidos con valores medios del 0-10 % comparados con el testigo.

También hay que tener en cuenta que las distintas pruebas en las que se ha evaluado la germinación se han realizado en estado de plántula o pequeña planta, con tamaños de raíces muy reducidos si los comparamos con las raíces que el cultivo alcanza en segundo año, más de un metro. Esto nos puede

sugerir que dichos valores de germinación pueden ir a más en cultivo en campo, y en especial en el segundo año de cultivo.

Resultados contrarios a los obtenidos en este estudio fueron presentados por Fernández-Aparicio *et al.* 2009. Estos autores no encontraron germinación de semillas de jopo en *H. coronarium*; probablemente por la evaluación de un sólo genotipo de esta especie, en concreto del cultivar Grimaldi, el cual puede compartir respuesta con las entradas *Hc-26* y *Hc-30* que tampoco indujeron germinación .

De estos resultados se podría sugerir que el ataque de esta planta parásita a la especie *H. coronarium* no es muy agresivo, si comparamos estos valores con los obtenidos por otros autores para especies que se caracterizan por su alta susceptibilidad al ataque del jopo. Entre estas podemos citar a la variedad Messire de guisante, al cultivar Prothabon de habas, al cultivar S27 de veza y a la línea Vn-270 de alberjones entre otras, con porcentajes de germinación de 63,5, 46,4, 34,1 y 31,1 respectivamente (Rubiales *et al.*, 2003; Pérez de Luque, 2002; Nadal *et al.*, 2007).

Sin embargo, estos bajos valores de germinación y de nodulación, no deben hacernos pensar que el *Orobanche* no puede llegar a ser un problema para *H. coronarium*. La baja incidencia ejercida por el jopo en *H. coronarium*, constatada tanto en condiciones controladas como en el campo (Córdoba *et al.*, 2008) no puede ser obviada, ya que podría convertirse en un problema como ocurrió en guisante en el periodo 1995/1996. Hasta esa fecha se conocía que el guisante era hospedador de *O. crenata*, pero no había sido considerado como una amenaza por la comunidad científica y ni siquiera fue mencionado como una curiosidad (Hagedorn, 1984; Ali *et al.*, 1994; Cousin, 1997). Es a partir de ese año cuando el jopo se convirtió en un limitante para el cultivo del guisante, provocando una disminución de su cultivo de 32.000 ha en 1995/96 a 8.000 ha en los años sucesivos (Rubiales *et al.*, 1999).

El hecho de que *H. coronarium* sea hospedante de *O. crenata* puede ayudar a la propagación y multiplicación de esta planta parásita a otras zonas de cultivo, debido al modo de reproducción que presenta el jopo, el cual hace extremadamente difícil su control. Una sola planta de jopo puede producir hasta 500.000 semillas (Cubero y Moreno, 1979) provocando que el banco de semillas en el suelo se incremente rápidamente, permaneciendo viables en él durante muchos años y germinando al ser estimuladas por los exudados de las raíces de las plantas hospedantes. Además estas semillas pueden ser dispersadas fácilmente por los hombres, maquinaria, animales y el viento, existiendo el riesgo de propagación a otra áreas con similares condiciones climáticas, como pasó con *Phelipanche cumana* que rápidamente se extendió en el sureste de Europa desde los primeros informes al inicio del siglo XX, llegando a España a finales de 1970 (Melero-Vara, 1999). De forma similar, se produjo la introducción

de *Phelipanche ramosa* en Australia (Carter *et al.*, 1996) y en Chile (Díaz y Norambuena, 2001) y de *Orobanche minor* en USA (Osterbauer y Rehms, 2002).

Por otra parte, como en la mayoría de las especies de plantas, la recombinación en *Orobanche* ocurre a través de la reproducción sexual y su resultado dependerá en gran medida de su sistema de reproducción. *O. crenata* es descrita como una especie predominantemente alógama, de polinización cruzada principalmente por himenópteros, pero en ausencia de insectos puede tener un comportamiento autógeno (Cubero, 1983). Al ser alógama presentará una mayor diversidad genética (Hamrick y Nason, 1996; Dubois *et al.*, 2003; Nybom, 2004), y por lo tanto la recombinación genética será mucho más elevada, que junto a presiones de selección externas, podrían favorecer la aparición de nuevas razas o biotipos de jopos más virulentas que las ya conocidas y atacar más agresivamente a la zulla.

Rubiales *et al.* (1999) también apoya la hipótesis de que podrían originarse nuevos biotipos de *O. crenata* debido a que son poblaciones muy heterogéneas cromosómicamente (Cubero *et al.*, 1979) y genéticamente (Verkleij y Pieterse, 1994).

A pesar de los resultados obtenidos en el laboratorio, que mostraron niveles bajos de germinación de jopo, se deberían tomar medidas preventivas, no sólo por las posibles pérdidas en el cultivo, sino por el aumento del banco de semillas de *O. crenata* en el suelo.

## 5. REFERENCIAS

- Aalders, A.J.G., Pieters, R., 1985. In Vitro Testing With 2, 3, 5, Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) of *Orobanche crenata* Seed Metabolism. *Fabis Newsletter*, 13: 35-37.
- Ali, S.M., Sharma, B., Ambrose, M.J., 1994. Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 73: 15-126.
- Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., and Beale, M.H., 2003. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biol.*, 6:358-364.
- Carter, R.J., Cooke, D.A., Barker, W.R., Csurhes, S.M., 1996. Occurrence and control of *Striga*, *Orobanche* and *Cuscuta* in Australia. En: *Advances in Parasitic Plant Research, Proceedings of the 6th International Parasitic Weed Symposium, Spain* (Eds.) Moreno, M.T., Cubero, J.I. pp 801-808.
- Cook, C.E, Whichard, L.P., Turner B., Wall M.E., Gley G.H.E., 1966. Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154: 1189-1190.
- Córdoba, E.M, González-Verdejo, C.I., Die, J., Román, B., Nadal, S., 2008. First Report of *Orobanche crenata* on Sullá (*Hedysarum coronarium*) in Andalusia, Southern Spain. *Plant Dis*, 92(12): 1.709-1709.

- Cousin, R., 1997. Peas (*Pisum sativum* L). Field Crops Res. 53: 111-130.
- Cubero, J.I., 1983. Parasitic diseases in *Vicia faba* L. with special referente to broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) En: The Faba Bean. (Ed.) Hebblethwaite, P.D. pp 493-521.
- Cubero, J.I., Moreno, M.T., 1979. Agronomic control and sources of resistance in *Vicia faba* to *Orobanche* sp. En: Some current research on *Vicia faba* in Western Europe. (Eds.) Bond, D.A., Scarascia Mugnozza, G.T., Poulsen, M.H. Commission of the European Communities: Luxembourg. pp 41-80.
- Cubero, J.I., Moreno, M.T., Martín, A., 1979. Meiotic behaviour in *Orobanche crenata* Forks. En: Proc. 2nd Symposium on Parasitic Weeds. (Eds.) Musselman, L.J., Worsham, A.D., Eplee, R.E. Raleigh, N.C., U.S.A. pp 73-78.
- Díaz, J., Norambuena, H., 2001. Parasitism and phenology of *Orobanche ramosa* on tomato. En: Proceedings of the Seventh International Parasitic Plant Symposium. (Eds.) Fer, A., Thalouarn, P., Joel, D.M., Musselman, L.J., Parker, C., Verkleij, J.A.C. Faculté des Sciences, Nantes, France. p 47.
- Dubois, S., Cheptou, P.O., Petit, C., Meerts, P., Poncelet, M., Vekemans, X., Lefèbvre, C., Escarrè, J., 2003. Genetic structure and mating systems of metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens*. New Phytologist., 3: 633-641.
- Fernández-Aparicio, M., Flores, F., Rubiales, D., 2009. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. Ann Bot., 103: 423-431.
- Gómez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C., Rochange, S.F. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature, 455 (7210): 180–194.
- González-Verdejo, C.I., Barandiaran, X., Moreno, M.T., Cubero, J.I., Di Pietro, A., 2005. An improved axenic system for studying pre-infection development of the parasitic plant *Orobanche ramosa*. Annals Bot, 96: 1121-1127.
- Hagedorn, D.J., 1984. Compendium of Pea Diseases, APS Press, USA.
- Hamrick, J.L., Nason, J.D., 1996. Consequences of dispersal in plants. En: Population dynamics in ecological space and time. (Eds) Rhodes, E.O., Chesser, R.K., Smith, M.H. The University of Chicago Press: Chicago, IL. pp 203-236.
- Little, T.M., Hills, F.J., 1989. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. (Ed.) México: Trillas. p 270.
- López, F., García, L., 2000. Longevidad de la semilla de jopo (*Orobanche crenata*) en condiciones de campo y laboratorio. Phytoma, 125: 42-48.
- Melero-Vara, J.M., 1999. Pathogenic variability in *Orobanche cumana* Wallr. En: Resistance to *Orobanche*: The State of the Art. (Eds.) Cubero, J.I., Moreno, M.T., Rubiales, D., Sillero, J.C. Junta de Andalucía, Sevilla, pp 49–155.

- Nadal, S., Cubero, J.I., Moreno, M.T., 2007. Sources of resistance to broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in narbon vetch. *Plant Breed*, 126: 110-112.
- Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol*, 13: 1143-1155.
- Osterbauer, N.K., Rehms, L., 2002. Detecting single seeds of small broomrape (*Orobanche minor*) with a polymerase chain reaction. Online. *Plant Health Progress*. Doi: 10.1094/PHP-2002-1111-01-RS.
- Pérez de Luque, A., 2002. Caracterización de los mecanismos de resistencia a jopo (*Orobanche crenata* Forsk.) en guisantes (*Pisum spp.*), Habas (*Vicia faba* L.) y otras leguminosas de interés agronómico. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Pérez de Luque, A., Jarrín, J.V., Rubiales, D., 2004. Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica*, 32: 21-29.
- Rubiales, D., Sillero, J.C., Cubero, J.I., 1999. Broomrape (*Orobanche crenata*) as a major constraint for pea cultivation in southern Spain. En: *Resistance to Orobanche: The state of the art* (Eds.) Cubero, J.I., Moreno, M.T., Rubiales, D., Sillero, J.C. Junta de Andalucía, Sevilla, pp 83-89.
- Rubiales, D., Pérez de Luque, A., Cubero, J.I., Sillero J.C., 2003. Crenate broomrape (*Orobanche crenata*) infection in field pea cultivars. *Crop Protect*, 22: 865-872.
- Sillero, J.C., Cubero, J.I., Fernández-Aparicio, M., Rubiales, D., 2005. Search for resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in *Lathyrus*. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 4: 7-9.
- Smith, F.A., 1951. Tetrazolium salt. *Science*, 113: 751-754.
- Tennat, D., 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol*, 63: 955-1001.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyozuka, J., Yamaguchi, S., 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455 (7210): 195-200.
- Van Hezewijk, M.J., Van Beem, A.P., Vrkleij, J.A.C., Pieterse, A.H., 1993. Germination of *Orobanche crenata* seeds, as influenced by conditioning temperatura and period. *Can J of Botany*, 71: 786-792.
- Verkleij, J.A., Pieterse, A.H., 1994. Genetic variation of *Orobanche* (broomrape) and *Striga* (witchweed) in relation to host specificity. En: *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Int. Workshop on *Orobanche* and Related *Striga* Research. (Ed.) Borg, S.J. The Netherlands. pp 67-69.

## CAPÍTULO IV

---

Contenido de taninos condensados en *Hedysarum coronarium* L.



## 1. INTRODUCCIÓN

La eficiencia de la conversión del alimento consumido está relacionada principalmente con su valor nutritivo, las condiciones sanitarias, factores climáticos y ambientales.

En la naturaleza y dentro de los forrajes utilizados en los sistemas de producción de diferentes regiones del mundo, existen macromoléculas complejas capaces de interferir en los procesos digestivos afectando el consumo, el crecimiento y hasta el valor nutritivo de los mismos. Estas moléculas son conocidas genéricamente con el nombre de taninos. Existen tres tipos de taninos siendo los taninos condensados (TC) los que poseen mayor capacidad de interactuar con otras moléculas afectando a la producción animal (Hagerman y Carlson, 1998).

En la actualidad, existe un creciente interés en los TC como integrantes de las dietas de rumiantes, debido a los beneficios potenciales sobre el valor nutritivo de la dieta y la salud del animal. Según su concentración en el forraje, como se indicó en la Introducción, las respuestas obtenidas pueden ser diferentes.

El valor forrajero de algunas leguminosas seleccionadas por su buen comportamiento agronómico, podría verse limitado por niveles altos de taninos condensados (Cano *et al.*, 1994; Carulla, 1994), haciendo necesario la selección de especies y ecotipos con determinadas cantidades de estos compuestos.

El interés que ha despertado el cultivo de *Hedysarum coronarium* L. (zulla), ha sido debido entre otros aspectos, a la presencia de TC en sus hojas y tallos. Distintos trabajos exponen una gran variación en el contenido de estos compuestos en esta especie, mostrando valores que oscilan entre 4 y 120 g TC/kg MS (Tabla 1).

**Tabla 1: Contenido de taninos condensados (TC) en toda la planta de zulla (o en tallos y hojas cuando se citan)**

<b>Taninos condensados (g/kg MS)</b>	<b>Referencias</b>
4-14 (tallos)	Piluzza <i>et al.</i> , 2000
22-40 (hojas)	Piluzza <i>et al.</i> , 2000
20-40	Barry <i>et al.</i> , 1986
31-35	Niezen <i>et al.</i> , 2002
35	Hoskin <i>et al.</i> , 2000
44	Roy <i>et al.</i> , 2002
45-47	Terrill <i>et al.</i> , 1992
53	Roy <i>et al.</i> , 2004
64	Birmingham <i>et al.</i> , 2001
72	Stienezen <i>et al.</i> , 1996
72	Douglas <i>et al.</i> , 1999
56	Burke <i>et al.</i> , 2004
51-84	Hoskin <i>et al.</i> , 1999
99-120	Niezen <i>et al.</i> , 1995

Amato *et al.* (2005) han puesto de manifiesto que la gran variabilidad existente en la concentración de TC en zulla es debido a diferentes factores entre ellos el ambiente, la etapa de desarrollo y el genotipo y probablemente la interacción entre ellos.

El objetivo de este trabajo fue conocer la variabilidad de la concentración de TC en los genotipos de *H. coronarium* que forman nuestra colección de trabajo. Esta información complementará la caracterización morfológica y evaluación agronómica del germoplasma estudiado, para identificar qué genotipos pueden ser usados en futuros programas de mejora genética de la especie.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

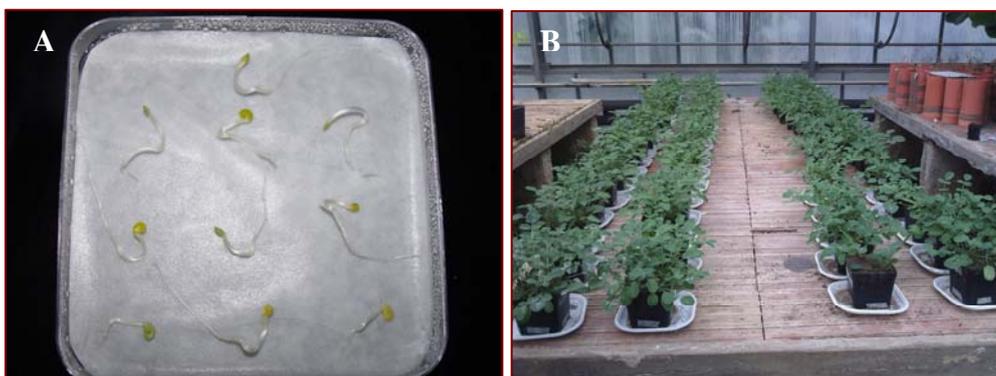
### **2.1. Material Vegetal**

El material vegetal estudiado incluyó 27 entradas de *H. coronarium* (*Hc-1, Hc-3, Hc-4, Hc-5, Hc-6, Hc-7, Hc-8, Hc-9, Hc-10, Hc-11, Hc-12, Hc-13, Hc-14, Hc-15, Hc-18, Hc-22, Hc-23, Hc-24, Hc-26, Hc-27, Hc-28, Hc-29, Hc-30, Hc-31, Hc-32, Hc-33* y *Hc-34*) procedentes de la colección de trabajo del IFAPA y tres variedades comerciales Carmen, Grimaldi y “Del País”. En la Tabla 1 del

Capítulo I (página 50), se muestran los datos de pasaporte de los genotipos. Además, se incluyeron 7 ecotipos (Centuripe, Petralia, Monterosso, Torresalsa, Romano, Palazzolo y Scarpata) y un agroecotipo (Gangi) sicilianos, más los cultivares italianos S. Omero y Grimadi que formaban parte de la colección de trabajo de la Universidad de Palermo (Sicilia).

## 2.2. Preparación de las muestras.

Las semillas de zulla fueron pregerminadas, en placas petri con papel húmedo secante y se guardaron en oscuridad a 20-25 °C durante tres días (Figura 1.A). Previamente habían sido esterilizadas en 3,5 % de hipoclorito sódico durante 10 minutos y luego lavadas tres veces con agua destilada estéril. A los tres días de la germinación las plántulas se trasplantaron a macetas de 1 litro que contenían tres partes de suelo, una parte de turba y aproximadamente 1 cm de lapillo volcánico en el fondo. Para cada genotipo se utilizaron dos macetas que contenían cinco plantas. Éstas se mantuvieron en condiciones controladas de invernadero (25 °C) hasta el muestreo (Figura 1.B)



**Figura 1: (A) Pregerminación de semillas de *H. coronarium*. (B) Genotipos de *H. coronarium* en condiciones controladas, utilizados en el análisis de taninos condensados.**

A los 45 días se recogieron individualmente hojas jóvenes de todas las plantas de cada genotipo, se mezclaron y se tomaron dos muestras homogéneas para determinar la concentración de TC. Tras esta primera evaluación, a los 75 días de los genotipos que presentaron unas de las mayores y menores concentraciones de estos compuestos se recolectaron muestras individuales de hojas de cada uno de los 10 individuos, para estudiar la variabilidad intrapoblacional de este parámetro. Las muestras se pusieron en bolsas de polietileno y en cajas térmicas con hielo para detener los procesos biológicos de la planta. Luego se almacenaron en un congelador a -20 °C y posteriormente se

secaron en un liofilizador. Una vez secas las muestras se molieron pasándose por una criba de 1 mm y se almacenaron en un congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

### 2.3. Determinación de taninos condensados

Esta evaluación se desarrolló en el Departamento de Ciencias de Entomología, Fitopatología, Microbiología Agraria y de Zootecnia, bajo la dirección de la Dra. Adriana Bonanno en Palermo, Italia.

Las muestras fueron analizadas para determinar la concentración de TC por el método del butanol-HCl- $\text{Fe}^{3+}$  descrito por Porter *et al.* (1986), utilizando la delfinidina como estándar de referencia (Tava *et al.*, 2005). Este método es más efectivo que el ensayo con Vainillina-HCl, por ser específico para los flavonoides polimerizados (proantocianidinas).

Constituye la principal forma de cuantificación de estos metabolitos y consiste en la depolimerización por hidrólisis ácida con posterior formación de productos antocianidínicos, los cuales son detectados mediante la técnica espectrofotométrica UV-VIS (García, 2004).

Los taninos condensados libres se extrajeron utilizando muestras (15 mg) por duplicado con una mezcla de 10 ml de acetona acuosa al 70 % y ácido ascórbico al 0,1 % en tubos de ensayo que se agitaron durante 1 hora en un baño de ultrasonido con hielo. Trascorrido este tiempo los tubos se dejaron enfriar aproximadamente durante 2 minutos. A continuación, de la fase acuosa se tomaron alícuotas de 1 ml que se mezclaron con 6 ml de Butanol/HCl (5 %) y 0,2 ml de una solución al 2 % de sulfato de amonio férrico en HCl 2N como agente catalizador. Después de una agitación previa, la mezcla se colocó en un baño a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos. Se obtuvo una solución de color rojo intenso indicando la presencia de antocianidinas. Las muestras fueron enfriadas antes de leer su absorción atómica a 550 nm en un espectrofotómetro DR/4000 UV-VIS.

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración de delfinidina (antocianidina). 1 mg de delfinidina se disolvió en 1 ml de Butanol/HCl (5 %), obteniéndose la solución madre. Para construir la curva de calibrado se utilizaron cinco puntos, correspondiéndose cada uno a 0, 40, 50, 80 y 100  $\mu\text{l}$  de la solución madre, llevados a un volumen total de 10 ml con Butanol/HCl (5 %) respectivamente, obteniéndose así cinco soluciones de  $\mu\text{l/ml}$  de delfinidina. Estas soluciones se leyeron a la longitud de onda elegida, 550 nm, y con los datos obtenidos se estableció la ecuación de regresión  $y = ax + b$ , donde  $y$ = absorbancia,  $x$ = concentración de taninos.

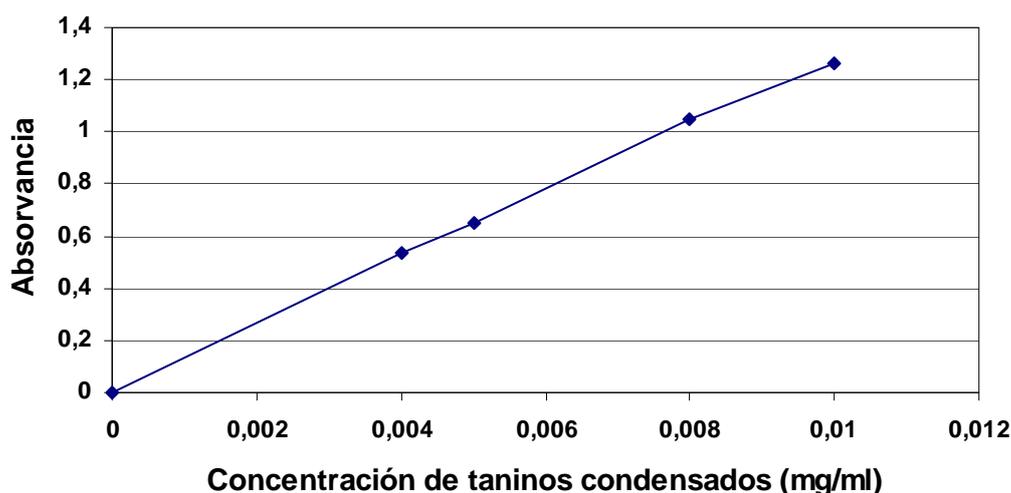
$$\text{Concentración } (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{\text{Absorbancia} - b}{a}$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de TC de la materia seca.

El análisis de la varianza (ANOVA) se hizo de una vía para la concentración de TC entre diferentes genotipos y entre individuos de una misma población. También se determinó la existencia o no de diferencias en la concentración de TC, según el origen de las entradas. Las comparaciones entre medias se realizaron mediante el test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

La cantidad de TC presente en las diferentes entradas de *H. coronarium*, se cuantificaron por interpolación en una curva de calibrado de delfinidina con un coeficiente de determinación igual a 0,9989 (Figura 2).



**Figura 2:** Curva de calibración de delfinidina para la estimación de taninos condensados en *Hedysarum coronarium L.*

En la Tabla 2 se presenta la concentración de TC de los diferentes genotipos de zulla, correspondiendo estos datos a la media de las dos repeticiones. También se presenta el valor medio del parámetro anteriormente indicado del total de las entradas evaluadas, junto al error estándar de la media como expresión de la variabilidad del germoplasma estudiado. Se muestra la mínima diferencia significativa (MDS) entre genotipos, al 5 %, es decir, para que un genotipo sea significativamente superior a otro para el contenido de TC, la diferencia entre ambos tiene que ser

superior al valor de la MDS. Y por último, se incluye también el dato del coeficiente de variación (C.V.) que es una estimación de la variabilidad del mismo. Coeficientes bajos indican una variabilidad aceptable.

En nuestro estudio, los genotipos de *H. coronarium* presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la concentración de TC en hojas. El coeficiente de variación 5,54 fue bajo indicándonos que nuestros resultados eran fiables. Los valores medios fueron de 3,3 % de la materia seca (MS), es decir, 33 g TC/ kg MS (Tabla 2). Cuando se compararon las medias de la concentración de TC de los diferentes genotipos, los resultados obtenidos mostraron que el ecotipo siciliano Scarpata fue el que presentó un mayor contenido (5 % de la MS), seguido de *Hc-31* (4,89 % de la MS). Por el contrario, *Hc-12* fue el de menor concentración con un valor medio de 1,47 % de la MS.

**Tabla 2: Concentración de taninos condensados (% de la MS) en tejidos de hojas de diferentes genotipos de *Hedysarum coronarium L***

Variedad/ecotipo	Concentración de Taninos condensados (% MS)
<i>Hc-1</i>	1,67±0,07
<i>Hc-3</i>	3,82±0,03
<i>Hc-4</i>	3,05±0,13
<i>Hc-5</i>	3,19±0,44
<i>Hc-6</i>	2,72±0,04
<i>Hc-7</i>	3,05±0,01
<i>Hc-8</i>	2,69±0,02
<i>Hc-9</i>	3,09±0,02
<i>Hc-10</i>	3,21±0,2
<i>Hc-11</i>	3,36±0,07
<i>Hc-12</i>	1,47±2,56
<i>Hc-13</i>	2,41±0,05
<i>Hc-14</i>	2,94±0,03
<i>Hc-15</i>	3,02±0,05
<i>Hc-18</i>	3,47±0,04
<i>Hc-22</i>	2,72±0,1
<i>Hc-23</i>	3,22±0,1
<i>Hc-24</i>	2,67±0,09
<i>Hc-26</i>	2,63±0,07
<i>Hc-27</i>	3,12±0,03
<i>Hc-28</i>	3,64±0,44
<i>Hc-29</i>	3,71±0,1
<i>Hc-30</i>	4,07±0,04
<i>Hc-31</i>	4,89±0,02
<i>Hc-32</i>	3,13±0,12
<i>Hc-33</i>	3,42±0,13
<i>Hc-34</i>	3,07±0,12
<b>Carmen cv.</b>	3,93±0,17
<b>Grimaldi(A*) cv.</b>	4,25±0,06
<b>Del Pais cv.</b>	4,10±0,03
<b>Centuripe</b>	4,19±0,1
<b>Grimaldi(S*) cv.</b>	2,82±0,08
<b>Petralia</b>	3,46±5,8
<b>Monterosso</b>	3,54±0,13
<b>Torresalsa</b>	2,4±1,38
<b>S. Omero cv.</b>	3,22±0,01
<b>Romano</b>	3,81±0,09
<b>Palazzolo</b>	3,48±1,52
<b>Gangi</b>	4,42±0,07
<b>Scarpata</b>	5±0,04
<b>Media</b>	3,3±0,08
<b>C.V. %</b>	5,54
<b>MDS (5%)</b>	0,76

Nota: C.V.: coeficiente de variación y MDS: mínima diferencia significativa. MS: materia seca. A\*: Andalucía, S\*: Sicilia.

Los resultados del análisis de la varianza también muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la concentración de TC en los genotipos según su origen (Tabla 3). Al comparar las medias, los genotipos de Sicilia formaron el grupo que presentaba el mayor contenido de estos metabolitos (3,63 % de la MS), mostrando los genotipos españoles una media de 3,19 % de la MS.

**Tabla 3: Resultados del análisis de la varianza para la concentración de taninos condensados según el origen de los genotipos de *H. coronarium*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios
Repetición (Rep)	1	0,0178	0,01785ns
País (P)	1	2,9362	2,93616*
Rep*P	1	0,0118	0,01181ns
Error	76	40,8188	0,53709
Total	79		
C.V.		21,45	

**Nota: \*, significativo al 0,05 de probabilidad. Ns: No significativo**

Una vez determinada la concentración de TC en los diferentes genotipos de *H. coronarium* incluidos en este estudio, se realizó un análisis de la varianza entre diferentes individuos de una misma población para este mismo parámetro. Se seleccionaron 4 poblaciones, dos españolas y dos sicilianas por presentar unas de las mayores y menores concentraciones de TC (*Hc-12*, *Hc-31*, Torresalsa y Centuripe). Los resultados obtenidos mostraron en todas las poblaciones diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre individuos (Tablas 4-7). Los valores medios obtenidos para los genotipos de *H. coronarium* fueron 1,44, 2,19, 1,88 y 3,62 % de la materia seca respectivamente.

**Tabla 4: Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población 12 de *Hedysarum coronarium L.***

<b>Población/individuo</b>	<b>Concentración de taninos condensados (% de la MS)</b>
<i>Hc-12/1</i>	1,33
<i>Hc-12/2</i>	1,34
<i>Hc-12/3</i>	0,93
<i>Hc-12/4</i>	1,95
<i>Hc-12/5</i>	2,47
<i>Hc-12/6</i>	1,16
<i>Hc-12/7</i>	0,93
<b>Media</b>	1,44±0,14
<b>C.V.%</b>	5,74
<b>MDS (5%)</b>	0,34

Nota: C.V.: coeficiente de variación y MDS: mínima diferencia significativa. MS: materia seca

**Tabla 5: Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población 31 de *Hedysarum coronarium L.***

<b>Población/individuo</b>	<b>Concentración de taninos condensados (% de la MS)</b>
<i>Hc-31/1</i>	1,51
<i>Hc-31/2</i>	1,97
<i>Hc-31/3</i>	1,98
<i>Hc-31/4</i>	2,00
<i>Hc-31/5</i>	2,06
<i>Hc-31/6</i>	1,92
<i>Hc-31/7</i>	2,90
<i>Hc-31/8</i>	2,16
<i>Hc-31/9</i>	2,95
<i>Hc-31/10</i>	2,44
<b>Media</b>	2,19±0,1
<b>C.V.%</b>	6,64
<b>MDS (5%)</b>	0,57

Nota: C.V.: coeficiente de variación y MDS: mínima diferencia significativa. MS: materia seca

**Tabla 6: Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población Torresalsa de *Hedysarum coronarium L***

<b>Población/individuo</b>	<b>Concentración de taninos condensados (% de la MS)</b>
Torresalsa/1	1,02
Torresalsa/2	2,37
Torresalsa/3	3,01
Torresalsa/4	1,55
Torresalsa/5	1,72
Torresalsa/6	2,23
Torresalsa/7	2,01
Torresalsa/8	1,36
Torresalsa/9	1,82
Torresalsa/10	1,73
<b>Media</b>	<b>1,88±0,12</b>
<b>C.V.%</b>	<b>7,46</b>
<b>MDS (5%)</b>	<b>0,55</b>

**Nota: C.V.:** coeficiente de variación y **MDS:** mínima diferencia significativa. **MS:** materia seca

**Tabla 7: Contenido de taninos condensados (% de la materia seca) en diferentes individuos de la población Centuripe de *Hedysarum coronarium L***

<b>Población/individuo</b>	<b>Concentración de taninos condensados (% de la MS)</b>
Centuripe/1	5,52
Centuripe/2	4,53
Centuripe/3	2,90
Centuripe/4	3,31
Centuripe/5	2,62
Centuripe/6	2,15
Centuripe/7	4,89
Centuripe/8	2,85
Centuripe/9	3,60
Centuripe/10	3,87
<b>Media</b>	<b>3,62±0,23</b>
<b>C.V.%</b>	<b>5,12</b>
<b>MDS (5%)</b>	<b>0,73</b>

**Nota: C.V.:** coeficiente de variación y **MDS:** mínima diferencia significativa. **MS:** materia seca

#### 4. DISCUSIÓN

Los parásitos gastrointestinales constituyen una de las limitantes sanitarias más importantes de los sistemas de producción de carne. Existe abundante información sobre el efecto negativo de los parásitos, pero poco se conoce sobre cómo reducir las pérdidas con medidas alternativas al uso de antihelmínticos cuya utilización excesiva ha generado problemas de resistencia. En los sistemas de producción de carne extensivos, conformados sobre la base de especies forrajeras templadas, es posible reducir el uso de antihelmínticos y limitar las pérdidas producidas por las parasitosis gastrointestinales (Robertson *et al.*, 1995). En estos sistemas es posible implementar programas sostenibles de control de parásitos, que incrementen la salud de los animales, conserven los recursos y protejan el medio ambiente.

La ingesta de plantas forrajeras con cantidades idóneas de TC parece proporcionar una solución parcial al control de los parásitos gastrointestinales de los rumiantes en pastoreo, a través de sus efectos en el ciclo de vida de estos parásitos (Hoste *et al.*, 2006).

Los taninos, fundamentalmente los condensados, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y, en general, su representación es mayor en las especies leñosas que en las herbáceas (McLeod, 1974; Bernays *et al.*, 1989). No obstante, existen variaciones muy amplias no sólo entre especies sino incluso entre individuos de la misma especie, como en el caso de *H. coronarium*, ya que la síntesis de taninos puede verse influida por numerosos factores, tales como el clima, grado de madurez de los tejidos, exposición a fitopatógenos etc. (Bate-Smith, 1973; Swain, 1977; Iason *et al.*, 1995; Amato *et al.*, 2005).

La concentración de TC en las plantas es controlada primariamente por factores genéticos y en segundo término por variables ambientales (Miller y Ehlke, 1996; McMahan *et al.*, 2000). En nuestro estudio el objetivo fue estudiar la concentración de estos metabolitos en distintos genotipos de *H. coronarium* en condiciones controladas del invernadero, para tener una idea general de su concentración en las entradas que forman nuestra colección de trabajo.

Si bien es conocido que en experimentos de cuantificación de taninos condensados es difícil comparar los resultados con los obtenidos por otros autores debido a procedimientos distintos, y en nuestro estudio a condiciones ambientales diferentes, los niveles de TC en los genotipos estudiados, excepto en algunas poblaciones, coinciden con la mayoría de los obtenidos por otros autores.

Los resultados de este estudio muestran una gran variabilidad en la concentración de TC en los diferentes genotipos de *H. coronarium* presentando unos valores que oscilaban entre 1,47-5 % de la materia seca. Estos resultados, presentaron un rango menor que el obtenido por Amato *et al.* (2005) en Sicilia (1,9-5,9 % de la MS). En Nueva Zelanda, Douglas *et al.* (1998) encontraron una

mayor variación en la concentración foliar en 32 genotipos de zulla incluyendo líneas y variedades comerciales. Por otra parte, Amato *et al.* (2007) en Sicilia y Piluzza *et al.* (2000) en Sassari, encontraron unos rangos menores (1,4-3 % de la MS y 2,5-4 % de la MS, respectivamente). Las diferencias encontradas con estos autores se podrían explicar por las condiciones ambientales, por el tipo de análisis utilizado en la cuantificación de dichos compuestos o por los estados de madurez de las hojas diferentes en el muestreo. En sentido general, la concentración de TC en todos los genotipos, excepto *Hc-1*, *Hc-12*, *Hc-30*, *Hc-31*, Centuripe, Scarpata, Gangi y los cultivares Grimaldi (*E\**) y Del País, se encontraron en el rango (2-4 % de la MS) en el cual los TC causan efectos beneficiosos en la nutrición animal (Barry y Mc Nabb, 1999; Montossi *et al.*, 1997). Los valores medios obtenidos para el cultivar Grimaldi (*S\**) fueron similares a los determinados por Piluzza *et al.* (2000) en Sassari (Italia). Además, estos últimos autores y Amato *et al.* (2005) obtuvieron unos valores medios de la concentración de TC en los genotipos evaluados de 3,3 % y 3,8 % de la materia seca respectivamente, valores similares al obtenido en nuestro experimento.

Por otra parte, los resultados mostraron diferencias en la concentración de TC en los genotipos según su origen, presentando las poblaciones sicilianas estudiadas un valor medio superior que las españolas (3,63 y 3,19 respectivamente). En el área donde se recolectaron estas poblaciones las diferencias edáficas y climáticas son probablemente las que podrían haber contribuido a modificar los genotipos de las poblaciones naturalizadas de los diferentes sitios en términos de la concentración de TC en el follaje. Esto puede haber ocurrido en el cultivar Grimaldi el cual presentó diferentes concentraciones según su origen (Tabla 1).

Por último en este estudio se constató una gran variación en la concentración de TC entre individuos de una misma población. Los valores medios de la concentración de estos metabolitos en los diferentes genotipos fueron menores a los obtenidos en la primera evaluación, excepto el ecotipo 12 que mantuvo una concentración similar. Las diferencias encontradas podrían deberse a un estado de madurez de las hojas diferente. Piluzza *et al.* (2000) determinaron en el cultivar Grimaldi una disminución de la concentración de dichos compuestos en hojas de la etapa vegetativa a la etapa de botones florales.

La concentración de TC en *H. coronarium* presentó diferencias significativas entre los genotipos, lo que refleja un grado importante de variabilidad en el material estudiado que permitiría *a priori* identificar genotipos de interés para programas de mejora.

## 5. REFERENCIAS

- Amato, G., Di Miceli, G., Giambalvo, D., Scarpello, C., Stringi, L., 2005. Condensed tannins content in sulla (*Hedysarum coronarium L.*) as affected by environment, genotype and growth stage. En: Bioactive compounds in pasture species for phytotherapy and animal welfare. (Ed.) Bullita, S. Cnr-Ispaam, Sassari. pp 41-54.
- Amato, G., Giambalvo, D., Graciano, D., Ruisi, P., 2007. Forage and seed yield os sulla (*Hedysarum coronarium L.*) varieties and landraces in a semi-arid Mediterranean environment. Bioforsk FOKUS, 2 (12): 68-72.
- Bate-Smith, E.C., 1973. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. Phytochemical, 12: 907-912.
- Barry, T.N., Manley, T.R., Duncan, S.J., 1986. The role condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. Br J Nutr., 55:123-137.
- Barry, T.N., Mc Nabb, W.C., 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. Br J Nutr., 81: 263-272.
- Bermingham, E.N., Hutchinson, K.J., Revell, D.K., Brookes, L.M., McNabb, W.C., 2001. The effect of condensed tannins in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on the digestion of amino acids in sheep. Proc NZ Soc Animal Prod., 61: 116-119.
- Bernays, E.A., Cooper Driver, G., Bilgener, M., 1989. Herbivores and plant tannins. Advances Ecol Res., 19, 263-302.
- Burke, J.L., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., Brookes, I.M., 2004. The potential of sulla in pasture-based system. Animal Production in Australia, 25:25-28.
- Cano, R.J., Carulla, E., Lascano, C.E., 1994. Métodos de conservación de muestras de forraje de leguminosas tropicales y su efecto en el nivel y la actividad biológica de los taninos. Pasturas Tropicales, 16(1): 2-7.
- Carulla, J.E., 1994. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tannins. Tesis Doctoral. University of Nebraska, Lincoln, E.U.
- Douglas, G.B., Keogh, R.G., Foote, A.G., 1998. Development of sulla (*Hedysarum coronarium*) for better adaptation to grazing. Proc NZ Grass Assoc., 60.
- Douglas, J.B., Stienezen, M., Waghorn, G.C., Foote, A.G., Purchas, R.W., 1999. Effect of condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on body weight, carcass fat depth, and wool growth of lambs in New Zealand. New Zeal J Agr Res., 42:55-64.
- García, D.E., 2004. Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. Pastos y Forrajes, 27(2): 101-116.
- Hagerman, A.E., Carlson, D.M., 1998. Biological responses to dietary tannins and other polyphenols. Agricultural and Food Chem., 2: 689 - 704.
- Hoskin, S.O., Barry, T.N., Wilson, P.R., Charleston, W.A.G., Kemp, P.D., 1999. Growth and carcass production of young farmed deer grazing sulla (*Hedysarum coronarium*), chicory (*Cichorium*

- intybus*), or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) with clover (*Trifolium repens*) pasture in New Zealand. New Zeal J Agr Res., 42: 83-92.
- Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Barry, T.N., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C., 2000. Effect of forage legumes containing condensed tannin on lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). Res Vet Sci., 68: 223-230.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol., 22: 253-261.
- Iason, G.R., Hodgson, J., Barry, T.N., 1995. Variation in condensed tannin concentration of a temperate grass (*Holcus lanatus*) in relation to season and reproductive development. J Chem Ecol., 21: 1103-1112.
- Mcleod, M.N., 1974. Plant tannins - their role in forage quality. Nutrition Abstracts and Reviews, 44: 803-815.
- McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y., Cheng, K.J., 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Can. J. Plant Sci. 80:469-485.
- Miller, P.R., Ehlke, N.J., 1996. Condensed tannins in birdsfoot trefoil: genetic relationships with forage yield and quality in NC-83 germplasm. Euphytica, 92:383-391.
- Montossi, F., Liu, F., Hodgson, J., Morris, S.T., 1997. Influence of low-level condensed tannins concentrations in temperate forage on sheep performance. En: Proceedings of the XVII International Grassland Congress Session 8: Tannins-Plant Breeding Animal Effects IDN 110 Winnipeg, Canada, 8:1-2.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C., 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either Lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J Agr Sci., 125: 281-289.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, D., Waghorn, G.C., Green, R., 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and immunity to gastrointestinal nematode. Vet Parasitol., 105: 229-245.
- Piluzza, G., Bullita, S., Deroma, M., Odoardi, M., 2000. The accumulation of condensed tannins in local populations of sulla. Cahiers Options Méditerranéennes, 45: 199-202.
- Porter, L., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. Phytochemistry, 1: 223-230.
- Robertson, H.A., Niezen, J.H., Waghorn, C.G., Charleston, W.A.G., Jinlong, N., 1995 The Effect of six herbage's on live weight gain, wool growth and fecal egg count of parasites ewe lambs. Proc NZ Soc Animal Prod., 55:199-201.
- Roy, N.C., Knight, T.W., Reynolds, G.W., Deighton, M.H., Death, A.F., Sinclair, B.R., Peters, J.S., McNabb, W.C., 2002. The effect of condensed tannins in fresh sulla (*Hedysarum coronarium*) on the net flux of fatty acid across the mammary gland and their secretion in the milk of lactating ewes. Proc. NZ Soc Animal Prod., 62: 321-235.

- Roy, N.C., Sinclair, B.R., Treloar, B., Kirk, A., Peters, J.S., Tavendale, M., McNabb, W.C., 2004. The effects of condensed tannins in sulla (*Hedysarum coronarium*) on valine kinetics in the ovine mammary gland. *Animal Production in Australia*, 25: 148-151.
- Stienezen, M., Waghorn, C.C., Douglas, G.B., 1996. Digestibility and effects of condensed tannins on digestion of sulla (*Hedysarum coronarium*) when fed to sheep. *New Zeal J Agr Res.*, 39: 215-221.
- Swain, T., 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annu Rev Plant Physiol.*, 28: 479-501.
- Tava, A., De Benedetto, M.G., Tedesco, D., Di Miceli, G., Piluzza, G., 2005. Proanthocyanidins from *Hedysarum*, *Lotus* and *Onobrychis* spp. Growing in Sardinia and Sicily and their antioxidant activity. En: *Proceedings of 20 th International Grassland Congress*. (Eds.) O'Mara, F.P., Wilkins, R.J., 't Mannetje, L., Lovett, D.K., Rogers, P.A.M., Boland, T.M.. Ireland. p 71.
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., Barry, T.N., 1992. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J Agr Sci.*, 119: 265-273.



## **CAPÍTULO V**

---

**Bases moleculares para estudios de expresión génica en  
*Hedysarum coronarium* L.**



## 1. INTRODUCCIÓN

El nivel de expresión de un gen se puede estudiar con precisión a través de la detección y/o cuantificación de los ARNm. Las técnicas que se han usado normalmente para evaluar la expresión de los genes han sido el análisis del Northern blot, la transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT)-PCR, los análisis de microarray, la hibridación *in situ* y la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Actualmente las técnicas más utilizadas son la qPCR (VanGuilder *et al.*, 2008; Bustin *et al.*, 2009; Pfaffl, 2010) y los análisis de microarray. Sin embargo, la fiabilidad de los datos obtenidos a través de la técnica de microarray pueden ser cuestionados ya que las plantas tienen un gran número de familias multigénicas y la hibridación cruzada entre el ADN complementario de estos miembros puede llevar a interpretaciones erróneas (Gachon *et al.*, 2004). Por lo tanto, una de las aplicaciones de la qPCR es confirmar los datos obtenidos en los estudios de microarray (Puthoff *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2008). Los beneficios de la qPCR respecto a otros métodos para medir el ARN son su rapidez, sensibilidad, especificidad y una cuantificación alta y precisa (Vandesompele *et al.*, 2009). La técnica qPCR permite seguir la síntesis del ADN complementario en tiempo real durante el proceso de amplificación, siendo posible determinar la cantidad del material de partida. Aunque el uso de qPCR para estudios de expresión génica en especies modelo, como *Arabidopsis thaliana* (Czechowski *et al.*, 2005), *Oryza sativa* (Kim *et al.*, 2003) y *Medicago truncatula* (Kakar *et al.*, 2008), es generalizado, la aplicación de esta herramienta para el estudio de *Hedysarum coronarium* L. (zulla) no se ha desarrollado en la actualidad.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, existen dos puntos críticos a la hora de realizar un ensayo de qPCR, la calidad y cantidad del material de partida.

La calidad del ARN se mide en base a tres parámetros básicos: la pureza, la integridad y la contaminación por ADN genómico.

La pureza, es el grado de no contaminación de las muestras con compuestos orgánicos e inorgánicos (p.ej. fenol, cloroformo, polisacáridos), y proteínas. Para determinar el grado de pureza del ARN se determinan las relaciones de absorbancia  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ , las cuales deben ser superiores a 1,8 y 2 respectivamente, para aceptar que el ARN obtenido tiene una pureza adecuada (Sambrook *et al.*, 1989; Manchester, 1996; Fox, 1998; Louime *et al.*, 2008).

La integridad, es el nivel de degradación del ARN y se puede determinar mediante la relación entre las bandas ribosomales 25S y 18S que se observan en un gel de agarosa o en electroforesis microcapilar. Un ARN se considera que no está degradado cuando la banda del 25S se muestra aproximadamente dos veces más teñida que la del 18S (Sambrook, 1989) y cuando la proporción 25S/18S determinada por el bionalizador es aproximadamente de 1,8 (Abrahams-Salaam, 2000).

La ausencia de ADN en las muestras se manifiesta cuando no se aprecian manchas cerca del pocillo de carga (Sambrook, 1989).

En cuanto a la cantidad de ARN, para partir de 1 µg usando “QuantiTec Reverse Transcription Kit” es necesario contar con una cantidad mínima de muestra de ~100 ng/µl para la síntesis de cDNA.

Por ello, la extracción del ARN de la muestra toma un papel crítico y fundamental, siendo este procedimiento en algunos casos difícil. Debido a que hay plantas que contienen altas cantidades de diferentes sustancias que pueden reducir la calidad y cantidad del ARN extraído, diversos autores han propuesto varios métodos para superar estas dificultades.

La presencia de altos contenidos de polifenoles y polisacáridos en ciertos tejidos de plantas, como es el caso de *Hedysarum coronarium* L., hacen que la extracción del ARN sea a menudo compleja, ya que estos compuestos pueden coprecipitar con los ácidos nucleicos. En el caso de los compuestos fenólicos, éstos se oxidan fácilmente, se enlazan covalentemente con las quininas, y se unen a los ácidos nucleicos (Loomis *et al.*, 1974), mientras que los polisacáridos pueden coprecipitar con el ARN en tampones de baja fuerza iónica. Para solventar estos problemas en zulla ha sido necesaria la adaptación de algunos de los protocolos existentes. Inicialmente se utilizaron dos metodologías: la del Trizol (Invitrogen, EE.UU.) que se utiliza comúnmente para el aislamiento de ARN total y el método de extracción modificado del borato sódico caliente propuesto por Wan y Wilkins (1994) para aislar el ARN de tejidos que contienen altos niveles de polifenoles y polisacáridos. Sin embargo, los intentos de utilizar estos protocolos para extraer el ARN total de hojas de zulla no lograron ofrecer una calidad lo suficientemente alta, para la amplificación en qPCR. Por lo tanto, ante la necesidad de un protocolo que proporcionara ARN de calidad, en este trabajo se modificó el procedimiento desarrollado por Louime *et al.* (2008) para extraer ARNm de hojas.

Pero además esta técnica tiene asociados otros problemas, al margen de la variación en la cantidad y calidad de ARN como la variabilidad de los protocolos de extracción que pueden copurificar inhibidores, la variabilidad en las reacciones de la transcripción reversa y la eficiencia de la PCR, teniendo todos ellos significativas repercusiones (Tichopad *et al.*, 2009; Tichopad *et al.*, 2010; Pugniere *et al.*, 2011) en los resultados. Por lo tanto, es necesaria la normalización para corregir estas fuentes de variabilidad.

Para normalizar los datos de qPCR, se han sugerido varias estrategias, incluyendo la normalización del tamaño de la muestra, el ARN total o ADN genómico, o el uso de una molécula artificial incorporada en la muestra (Huggett *et al.*, 2005). Por el momento, el método más común es el uso de genes de referencia internos, ya que potencialmente representan todas las fuentes de variabilidad mencionadas anteriormente. La importancia de estos genes para el análisis qPCR en

plantas ha sido destacado recientemente (Gutierrez *et al.*, 2008; Guénin *et al.*, 2009). El éxito de este procedimiento se basa en la elección de los genes control adecuados que sean estables en diferentes condiciones experimentales y en diferentes tipos de tejidos (Huggett *et al.*, 2005). Aunque se han desarrollado estudios sobre genes de referencia en algunas especies de plantas, como el trigo (Paolacci *et al.*, 2009), tomate (Coker *et al.*, 2003), la patata (Nicot *et al.*, 2005) y la uva (Reid *et al.*, 2006) entre otras, en *H. coronarium* no se ha realizado ningún trabajo.

Los genes de referencia utilizados comúnmente en otras especies de plantas son la actina, ubiquitina, tubulina, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) y el 18S ARN ribosomal (Huggett *et al.*, 2005; Brunner *et al.*, 2004). Sin embargo, varios estudios han demostrado que estos genes de referencia no son lo suficientemente estables porque sus niveles de expresión varían en los diferentes tejidos (Suzuki *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Selvey *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002; Czechowski *et al.*, 2005), siendo necesario realizar estudios preliminares para identificar el gen o genes de referencia más estables en cada especie.

En *Arabidopsis* (Czechowski *et al.*, 2005) y en cebada (Faccioli *et al.*, 2007) se han identificado nuevos genes de referencia, mostrando algunos de ellos una expresión más estable que los comúnmente utilizados. El número de genes de referencia requeridos como estándar internos según Thellin *et al.* (1999) y Vandesompele *et al.* (2002) es dos o tres, ya que un sólo gen para normalizar podría conducir a errores.

Por lo tanto, ante la necesidad de un protocolo que proporcionara ARN de calidad y la falta de conocimientos en relación a qué genes de referencia podrían ser utilizados en posteriores estudios de expresión génica en zulla, los objetivos planteados en este capítulo fueron: (1) la optimización de un protocolo que proporcionara ARN en cantidad suficiente y de calidad y (2) la determinación de los genes de referencia para ser utilizados en futuros estudios de expresión génica en zulla.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Optimización de un protocolo de aislamiento de ARN de hojas de *Hedysarum coronarium* L. que proporcionara la cantidad y calidad requerida para estudios de expresión génica.**

#### **2.1.1. Material vegetal**

El material vegetal se recogió de plántulas de zulla a las veinte semanas de su germinación, mezclándose hojas de diez plantas para minimizar la variación de la expresión génica entre plantas

individuales. Inmediatamente después de su recogida se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

### 2.1.2. Metodología

Las soluciones y reactivos utilizados en el protocolo fueron los siguientes: tampón de extracción (0,25 M de ácido Tris-clorhídrico pH 8,0; 0,05 M EDTA pH 8,0; 2,5 M de cloruro de sodio; 2 % CTA.; 3 % de PVP-40 y el 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, añadido justamente antes de su uso), cloroformo: alcohol isoamílico (CI) 24:1 frío (-20 °C); isopropanol frío (-20 °C), acetato de sodio 3 M pH 5,2, cloruro de litio 9 M (4 °C) y agua MiliQ autoclavada. Todas las soluciones se prepararon con agua MiliQ y fueron autoclavadas durante 20 minutos a 1 atm.

A continuación se describen los pasos del protocolo de extracción optimizado, marcando en negrita los cambios aplicados:

1. En tubos de centrífuga de 2 ml se colocó 1 g del tejido macerado y se agregó **1 ml del tampón de extracción** (en lugar de los 800  $\mu$ l del protocolo original) precalentado a 65 °C. Se aplicó vortex por 5 s, apareciendo un homogeneizado viscoso.
2. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos, con vortex intermitentes de 4 segundos cada 2 minutos y a continuación se centrifugaron a 13.400 rpm durante 10 min a 4 °C.
3. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) frío, se agitaron por vortex y **se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente** (paso incluido al protocolo original)
4. Se centrifugaron a 13.400 rpm durante 10 min a 4 °C para separar las fases.
5. La fase superior formada se transfirió a un nuevo tubo con **un volumen de 1/10 de acetato de sodio 3 M** (en lugar de 1/9) y se mezcló todo mediante agitación. Después se añadió un volumen de isopropanol frío, mezclando por inversión los tubos.
6. Los tubos fueron centrifugados a 13.400 rpm durante 10 min a 4 °C, y se desechó el sobrenadante con ayuda de una pipeta.
7. El precipitado **se resuspendió en 300  $\mu$ l de agua MiliQ autoclavada** (en lugar de los 750  $\mu$ l del protocolo original). Dependiendo del tamaño del pellet, se añadió o no una mayor cantidad de agua.
8. Al pellet resuspendido se le añadió 250  $\mu$ l de cloruro de litio 9 M para mezclar por inversión de los tubos y se incubaron a 4 °C durante aproximadamente unas **20 horas**. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 13.400 rpm durante 20 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante mediante pipeteo.

9. **El ARN precipitado se secó a temperatura ambiente en una cámara de flujo durante 5-10 min, se resuspendió en 30-50 µl de agua MiliQ autoclavada y se calentó en un termobloque a 55 °C para disolverlo bien en agua y obtener una solución homogénea (paso incluido al protocolo original)**

Para demostrar la integridad de las muestras de ARN, 1,5 µg de ARN total extraído de hojas de zulla se desnaturalizó por electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2 % (w/v) según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para evaluar la cantidad de ARN a través del nivel de fluorescencia de cada carril frente a la exposición a luz UV. La intensidad de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales se utilizó como control de carga. También se empleó la electroforesis microcapilar utilizando el Experion (Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.).

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una técnica establecida para la cuantificación del ARNm en muestras biológicas. Para obtener resultados fiables, esta técnica necesita un ARN de alta calidad, libre de ADN genómico y no degradado. La qPCR se llevó a cabo con el ARN extraído de hojas por el método modificado de Louime *et al.*, 2008 utilizando un kit SensiMix (dT) ADN según las instrucciones del fabricante (Quantace, Reino Unido). El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total usando “QuantiTec Reverse Transcription Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania), con una mezcla optimizada de cebadores oligo dT y cebadores al azar, según las indicaciones del fabricante. El ADN genómico fue eliminado durante este procedimiento mediante un tratamiento con DNasa. Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un par de cebadores del gen que codifica la subunidad ribosomal 18S (315 pb) bajo las siguientes condiciones: activación de la polimerasa (10 min a 95 °C), amplificación y cuantificación durante 40 ciclos (1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C).

## **2.2. Selección de genes de referencia en *Hedysarum coronarium* L. bajo distintos estreses y etapas de desarrollo**

### **2.2.1. Material vegetal.**

El experimento se llevó a cabo a partir de semillas de poblaciones silvestres de *Hedysarum coronarium*. Las semillas se germinaron en placas Petri sobre papel húmedo y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 20°C durante cinco días. Cuando la radícula alcanzó 4-5 cm de longitud, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 1 litro con un sustrato de perlita. Las plantas crecieron en una cámara de crecimiento Hotcold GL (J.P. Selecta, Barcelona, España) bajo una temperatura de

20°C y con un fotoperiodo de 14 horas; y se regaron con solución nutritiva (Hoagland y Arnon 1950).

Después de veinte semanas las plantas se sometieron a varios estreses abióticos (salino y hormonal). Para cada estrés se utilizaron macetas que contenían diez plantas. Las plantas fueron expuestas a estrés salino tratando el sustrato de perlita con 150ml de cloruro sódico a 100 mM y después de 36 horas, se recogieron dos grupos diferentes de hojas y raíces totales. Para el estrés hormonal las plantas se regaron con 125 ml de ácido diclorofenoxiacético (auxina) y a las 24 horas se recogieron mezclas de hojas y raíces totales. Las plantas control se cogieron en paralelo para obtener los mismos tejidos en los mismos intervalos de tiempo.

Por otra parte, de diez plantas se recolectaron cuatro grupos diferentes de hojas y raíces totales a las ocho semanas y cotiledones y radículas a los 11 días. Estos tejidos crecieron en condiciones normales (sin estreses) para ser utilizados como controles.

Se llevaron a cabo dos experimentos en paralelo y todos los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C hasta la extracción del ARN.

### **2.2.2. Extracción de ARN total y síntesis de cDNA.**

El ARN total se extrajo de muestras representativas de cada tejido o tratamiento de estrés para las dos repeticiones biológicas. El ARN total de las raíces, radículas y de los cotiledones se aisló utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) siguiendo la instrucciones del fabricante. Para extraer el ARN de hojas de zulla que tienen altos niveles de metabolitos secundarios, se desarrolló una optimización del método creado por Louime *et al.*, (2008), reduciendo la contaminación por polifenoles y polisacáridos. La concentración de ácidos nucleicos se midió usando un biofotómetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Por otra parte, también se determinó la pureza del ARN total como la relación 260/280 nm, obteniendo los valores esperados entre 1,9 y 2,1 y la integridad del ARN se evaluó de dos formas diferentes: por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1,2% (w/ v) y mediante electroforesis microcapilar con el Experion (Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.) cuyo software permite determinar el valor de RQI (indicador de calidad del ARN) para cada muestra.

Para asegurar el uso de la misma cantidad de cDNA, la concentración de ARN se midió dos veces por cada muestra y después las muestras se ajustaron a concentraciones iguales.

El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total usando “QuantiTec Reverse Transcription Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania), con una mezcla optimizada de cebadores oligo dT y cebadores al azar, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se diluyó en un volumen final de 100 µl. El ADN genómico fue eliminado durante este procedimiento mediante un tratamiento con DNasa y para verificar la ausencia de contaminación, las 24 muestras se analizaron usando un par de cebadores de

la tubulina mediante controles negativos (-RT). Este procedimiento consistió en alicuotar una fracción de cada muestra durante el proceso de retrotranscripción, a la que se le añadieron todos los componentes de la reacción excepto la transcriptasa inversa. Como control positivo se utilizó una cantidad equivalente al cDNA usado como molde, para la posterior amplificación por PCR (es decir, 15 ng de DNA genómico). Sólo si no se detectó amplificación en ninguno de los controles -RT después de 40 ciclos, las muestras de cDNA se consideraron como material adecuado para su posterior análisis.

### **2.2.3. PCR cuantitativa en tiempo-real y análisis de datos.**

Para el análisis realizado en este estudio se seleccionaron siete genes de referencia con diferentes funciones en los procesos celulares: la actina y la tubulina, que forman parte de la estructura del citoesqueleto, la ubiquitina implicada en la degradación de las proteínas y 18S ARN ribosomal que forma parte de la estructura del ribosoma. Además, se incluyeron dos nuevos candidatos, GH720838 un factor de transcripción AI y una helicasa que está implicada en la replicación del ADN. Para clonar los genes de la actina ( $\beta$ ACT), tubulina (TUA) y ubiquitina (UBQ) (Tabla 1) se utilizaron los cebadores degenerados descritos previamente por González-Verdejo *et al.* (2008) y como molde se usó ADN de hojas de *H. coronarium*.

Las condiciones de PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min y 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 35s, anillado a 56 °C durante 35s, y extensión a 72 °C durante 1 min. Por último, se incluyó un paso de elongación final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos amplificados se clonaron en pGEM-T (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y se secuenciaron. La correspondencia de los productos amplificados con el gen diana fue verificada por BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y las secuencias se utilizaron en el diseño de los cebadores específicos para qPCR. Se diseñaron cuatro pares de cebadores con el software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), utilizando como criterios una longitud máxima de fragmentos amplificados de 150pb, con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de aproximadamente 60 °C. Las secuencias de estos cebadores se muestran en la Tabla 2. La clonación del 18S ARN ribosomal (ARNr 18S) no fue necesario, porque actualmente hay cebadores específicos comerciales para ser utilizados en qPCR. Además, también identificamos ortólogos de dos genes de referencia en zulla, una helicasa y un factor de transcripción, que habían demostrado una expresión estable bajo distintas condiciones experimentales en guisante (Die *et al.*, 2010). Para clonar estos genes se usaron los cebadores específicos (Tabla 2) que habían sido descritos anteriormente por Die *et al.* (2010). Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados y sometidos a una búsqueda en el BLAST para la verificación de su identidad.

**Tabla 1: Secuencias de los cebadores degenerados, temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) y longitud del amplicón.**

Gen	Secuencia de los cebadores (5´- 3´)	Longitud del amplicón (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
<b>ACT</b>	GTN ARY AAC TGG GAT GAY ATG G ACA ATA CCW GTW GTR CGA CC	231	56.5
	GAA GAT GCT GCH AAY AAY TTY GC GAR AGH ACA CTG TTR TAA GGY TC		
<b>TUB</b>	GAY TAC AAC ATY CAG ARG GAG GCR AAR ATC ARC CTC TGC TG	392	56.0

**Tabla 2: Cebadores diseñados para qPCR. Longitud y temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del amplicón y eficiencia de amplificación (%)**

Nombre Gen	Número de entrada en el GenBank	Secuencia de los cebadores (forward/reverse) (5´-3´)	Longitud del amplicón (bp)	T <sub>m</sub> del amplicón (°C)	Eficiencia Amplificación (%)
<i>βACT</i>	HO710131	TCTCACGATTAGCCTTTGGGTTA CACCTGAGGAGCACCCAGTT	63	79.15	83
<i>TUA1</i>	HO710133	CCATAATCAACAGAAAGACGCTCTAG CGTTGGTGGAGGAACTGGTT	66	79.58	91
<i>TUA2</i>	HO710132	CACCAACGACATTGAAAACCAA TGGACCGCATCAGAAAGCTT	64	80.2	93
<i>UBQ</i>	HO710129	TCAAGGTCCTTACGAAGATTTGCA GAGTCCACCCTTCACCTTGTG	64	80.2	89
<i>Helicase</i>	HO710130	GCGGGCACTTGGAGATTATC ACACTGGTCCCTCCCACACA	45	78.54	89
<i>GH720838</i>	HO774967	GCAACCTCCTTCTCCTTGGAT TCTCCCGTCCTCCACATAA	75	78.79	91
<i>18S rRNA</i>		18S primer pair (Ambion)	315	84.31	90

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con un termociclador Mx3000P System (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) usando como fluoróforo SYBR Green. Cada reacción de PCR contenía 0,3µl 50x SYBR Green Solution, 7,5µl 2x SensiMix (dT) (Quantace, Londres, Reino Unido), 1,5µl de cDNA (15ng equivalente de ARN total) y 200nM de cada cebador específico en un volumen total de 15µl. Se preparó una mezcla de reacción con suficiente SYBR Green y reactivos de PCR y se utilizaron multipipetas electrónicas para dispensar el cDNA, con el fin de garantizar que todas las reacciones tuvieran cantidades iguales y reducir los errores de pipeteo. En una misma corrida de qPCR se amplificaron dos repeticiones biológicas de cada muestra utilizando todos los pares de cebadores descritos anteriormente y se realizó bajo las siguientes condiciones: la activación de la polimerasa (10 min a 95 °C), amplificación y cuantificación durante 40 ciclos (1 min

a 95 ° C, 1 min a 60 °C). Para asegurar la especificidad de los productos de PCR, se realizó un análisis de la curva de disociación de cada una de las muestras después de los 40 ciclos de amplificación (55-95 °C, con una lectura de fluorescencia cada 0,6 °C). Por otra parte, para cada reacción individual se calculó la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores mediante el algoritmo *LinReg* a partir de la fase exponencial de cada curva de amplificación según la ecuación  $(1 + E) = 10^{\text{pendiente}}$  y se determinó la E media de cada par de cebadores.

Por cada reacción, se utilizaron dos repeticiones técnicas y los datos se analizaron utilizando el software Mx3000P (versión 4.0). El valor del ciclo de cuantificación (Cq) (el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido) se determinó para cada muestra gen-cDNA. Todas las muestras fueron utilizadas para estimar la media de los Cq, y también se calculó la desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) (Anexo I). Los valores Cq se transformaron en cantidades relativas (CRs) utilizando la fórmula  $Q = E^{\Delta Cq}$ , donde E es la eficiencia media de la pareja de cebadores utilizados en la amplificación de un gen en particular y  $\Delta Cq$  es la diferencia entre la muestra con el menor Cq del conjunto de datos y el valor Cq de la muestra en particular. Para determinar la estabilidad de la expresión de los genes de referencia, los datos se analizaron a partir de dos algoritmos: geNORM (Vandesompele *et al.*, 2002), y BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). El archivo de Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) con los valores de CRs se importó al programa geNORM (versión 3.5) y se calculó el valor de estabilidad de la expresión (M) para cada gen. Un menor valor de M indica una mayor estabilidad, lo que sugiere que serían genes de referencia óptimos. A continuación, el programa realiza la eliminación progresiva de los genes que tienen los mayores valores de M hasta seleccionar el par de genes más estables. Por otra parte, geNORM también permite determinar el número de genes control necesarios para una normalización precisa mediante las variaciones entre pares (V). Las variaciones entre pares ( $V_n/V_{n+1}$ ) se calculan basadas en los valores del factor de normalización después de la inclusión sucesiva del gen de referencia según el orden de estabilidad decreciente. Una variación de genes dos a dos de  $V=0,15$  se acepta como punto de corte (Vandesompele *et al.*, 2002), por debajo del cual la adición de más genes de referencia no sería necesario.

Por otro lado, se empleó también el algoritmo BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). Éste realiza un análisis de correlación dos a dos para todos y cada par de genes candidatos. Para analizar el valor de la estabilidad de los genes estudiados, se utilizó el valor promedio del Cq (sin conversión a CR) de cada reacción por duplicado. La estabilidad de la expresión se calculó para todos los genes de referencia individualmente basada en los valores Cq y se expresó como el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar (SD). Los genes de referencia con valores de SD mayores que 1 podrían considerarse inconsistentes siendo excluidos de nuestro estudio y los genes con los valores

más bajos de SD serían propuestos para ser los más estables. Después el programa estimó la correlación entre todos los pares de genes de referencia. Para cada correlación se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y el valor de la probabilidad ( $P$ ). El índice BestKeeper (IB) combina todos los genes de referencia que están fuertemente correlacionados (media geométrica de los valores  $C_q$  de todos los genes que lo conforman). A continuación, el programa calcula las correlaciones entre cada uno de los genes de referencia candidatos y el IB determinando el coeficiente de correlación de Pearson, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el valor de  $P$ . Se propondría como gen más estable el que presentara el mayor coeficiente de correlación con el IB.

Por último, incluimos otro enfoque estadístico para consolidar los resultados obtenidos con los dos algoritmos anteriores. Esta herramienta estadística se utilizó para calcular la estabilidad de los genes potenciales de referencia, teniendo en cuenta el coeficiente de variación de los niveles de expresión relativa después de la normalización. El análisis se basó en las fórmulas (fórmula 11, 13, 15, 17, 18, 19 y 20) descritas en el software qBase (Hellemans et al., 2007). Lo ideal sería que la variación después de la normalización fuera nula, por lo tanto, los valores más bajos de CV denotan una mayor estabilidad (Vandesompele *et al.*, 2009).

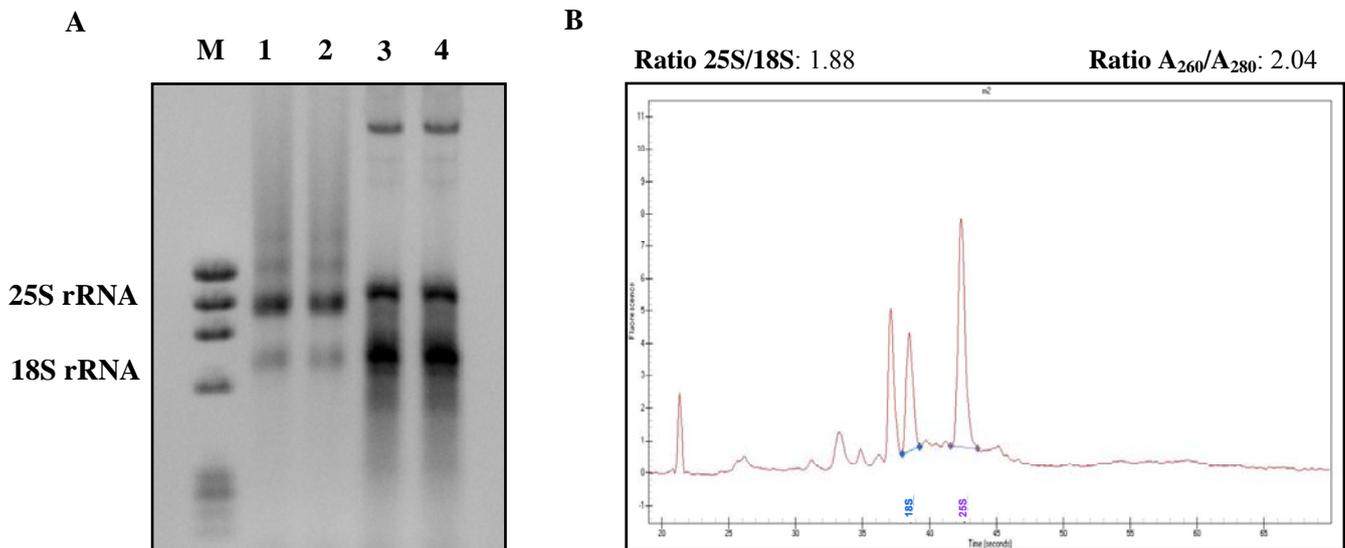
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Resultados del protocolo optimizado para el aislamiento de ARN de hojas de *H. coronarium***

Con el protocolo descrito en este estudio obtuvimos una cantidad y calidad aceptable de ARN apto para ser utilizado en estudios de expresión génica y concretamente en qPCR. Los rendimientos del ARN total de las dos muestras obtenidas por este método fueron 11,6 y 20,4  $\mu\text{g}$  ARN/g de peso fresco, valores suficientes para sintetizar a cDNA. El rango de absorbancia  $A_{260}/A_{230}$  fue superior a 2,0 y el  $A_{260}/A_{280}$  de 2 y 2,04. El ARN extraído por el método del borato sódico caliente dio un buen rendimiento, pero la pureza fue mala ( $A_{260}/A_{230}$  inferior a 2 y  $A_{260}/A_{280}$  de 1,4) y utilizando el Trizol tanto el rendimiento como la calidad no fueron aceptables ( $A_{260}/A_{230}$  inferior a 2 y  $A_{260}/A_{280}$  de 1,4).

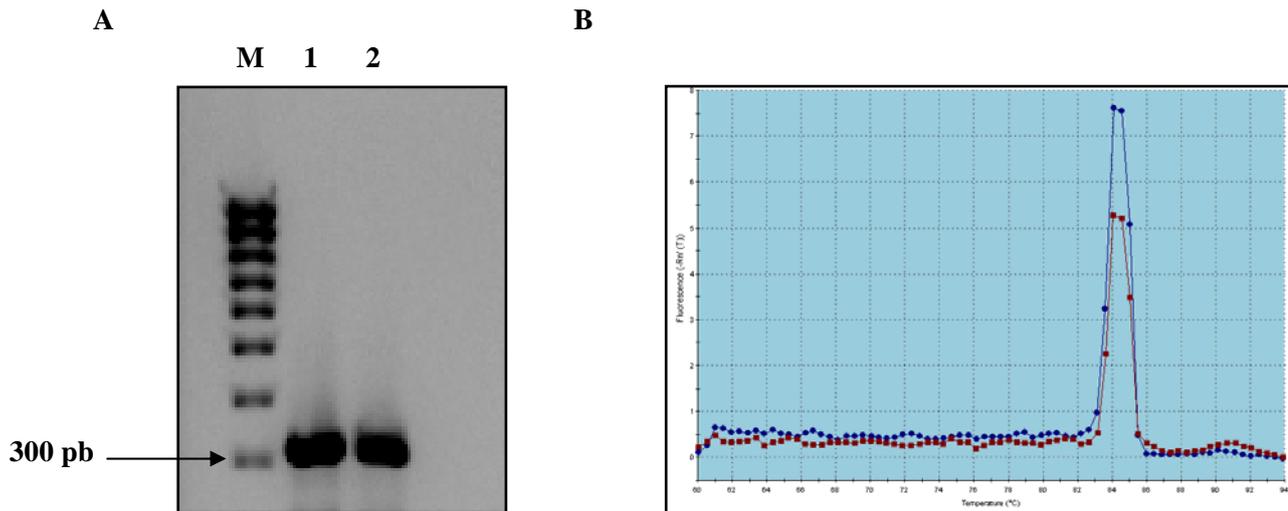
La integridad del ARN extraído por los tres métodos fue corroborada mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído (Figura 1.A). Las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 25S y 18S fueron claramente visibles en todos los carriles. Los carriles 1 y 2 del gel muestran un ARN de alta calidad y no degradado correspondiente al extraído por el protocolo descrito en este estudio. Las bandas del 25S ARNr se muestran aproximadamente dos veces más teñidas que las del 18S ARNr indicando que no existe degradación a diferencia de lo observado en las muestras 3 y 4. Además no se aprecian manchas cerca del pocillo de carga indicándonos que no

existe ADN en la preparación como en las otras dos muestras (Figura 1.A). Las relaciones  $A_{260}/A_{280}$  y 25S/18S determinadas por el bioanalizador Experion presentaron unos valores de 2,04 y 1,88 respectivamente. Por lo general una proporción 25S/18S de 1,8 indica un ARN de buena calidad (Abrahams-Salaam, 2000). Los picos que aparecen a la izquierda del 18S ARN ribosomal corresponden a ARN ribosómico de cloroplastos (Figura 1.B).



**Figura 1: Verificación de la integridad de ARN totales extraídos de *H. coronarium*.** (A) Las muestras de ARN totales obtenidas de las hojas fueron fraccionadas en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2 % y teñidas con bromuro de etidio para su visualización. En la imagen se observan las subunidades ribosomales 18S y 25S correspondientes a cuatro muestras de RNA totales: el carril M es el marcador de peso molecular de 175 pb; los carriles 1 y 2 corresponden al ARN extraído por el protocolo modificado; el carril 3 es el ARN extraído con Trizol y el carril 4 el ARN extraído por el método del borato sódico caliente. (B) Electroferograma obtenido para una muestra de ARN total de hojas de zulla extraído por el método propuesto en este estudio tras su migración en el bioanalizador Experion.

La calidad del ARN fue confirmada a través de qPCR utilizando un par de cebadores del gen 18S ARNr. La qPCR produjo el fragmento de cDNA esperado (315 pb), con una única banda indicando que éste era amplificable en PCR y estaba libre de inhibidores (Figura 2.A.). La verificación de la especificidad de los productos de qPCR se presentan en las curvas de disociación representadas en la Figura 2.B.



**Figura 2.** Verificación de la calidad de los ARNm. A partir de los mRNAs aislados de cada muestra se sintetizaron cDNAs de hebra simple, que se utilizaron como molde para la amplificación mediante qPCR. (A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR del ARN total extraído de hojas de zulla. (B) Verificación de los productos específicos de las reacciones de qPCR: Las curvas de disociación del 18S ARNr muestran un solo pico.

### 3.2. Resultados de la selección de genes de referencia en *Hedysarum coronarium* L.

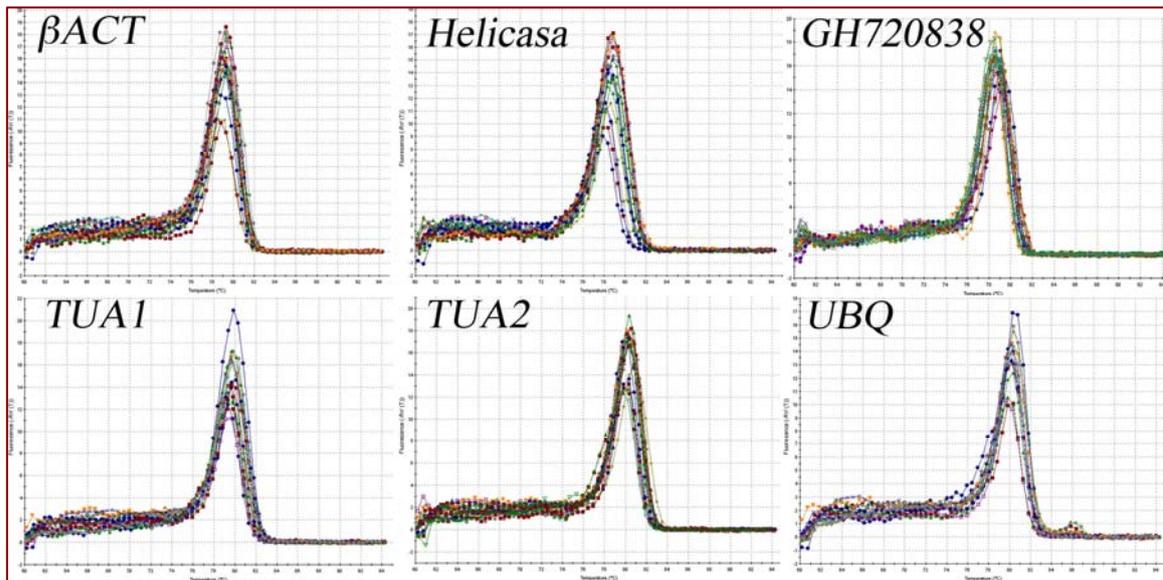
#### 3.2.1. Calidad del ARN

Se usaron dos protocolos de extracción para aislar los ARNs de 24 muestras de tejidos de *H. coronarium*, las cuales estaban formadas por raíces, radícula, cotiledones y hojas, expuestas a diferentes estreses abióticos. El ARN total purificado tuvo un valor medio de 2,07 (SD = 0,10) para la relación 260/280 nm. El kit de RT se utilizó para eliminar la contaminación de ADN genómico (gDNA), ya que incluye, como primer paso, la digestión de éste, y la ausencia de amplificación con el par de cebadores de la TUA2 en todas las reacciones de la -RT después de 40 ciclos confirmó la ausencia de ADN genómico.

#### 3.2.2. Especificidad y eficiencia de los cebadores en las reacciones de qPCR

En nuestro estudio se evaluaron siete genes de zulla que previamente habían sido utilizados como genes de referencia para los análisis de qPCR en otras especies (Tabla 2). Se incluyeron 5 genes de referencia clásicos ( $\beta$ ACT, TUA1, TUA2, UBQ y 18S rARN) y dos nuevos no tan frecuentemente utilizados como control (helicasa y GH720838) y utilizamos la qPCR para comprobar el rendimiento de amplificación de estos cebadores. La especificidad de los amplicones se

confirmó analizando las curvas de disociación que mostraron amplificación de un único producto (un sólo pico) y ausencia de dímeros (Figura 3). Los amplicones de la PCR fueron secuenciados, y los productos amplificados se correspondieron con los genes diana. La eficiencia de los cebadores se calculó con el programa *LinReg* partir de los datos individuales de fluorescencia crudos generados en la qPCR. Todos los cebadores fueron genes específicos y las eficiencias medias tuvieron valores comprendidos entre el 83 y 93% (Tabla 2).



**Figura 3: Especificidad de la reacción de qPCR. Curvas de disociación de todos los genes de referencia en las que se observa un solo pico.**

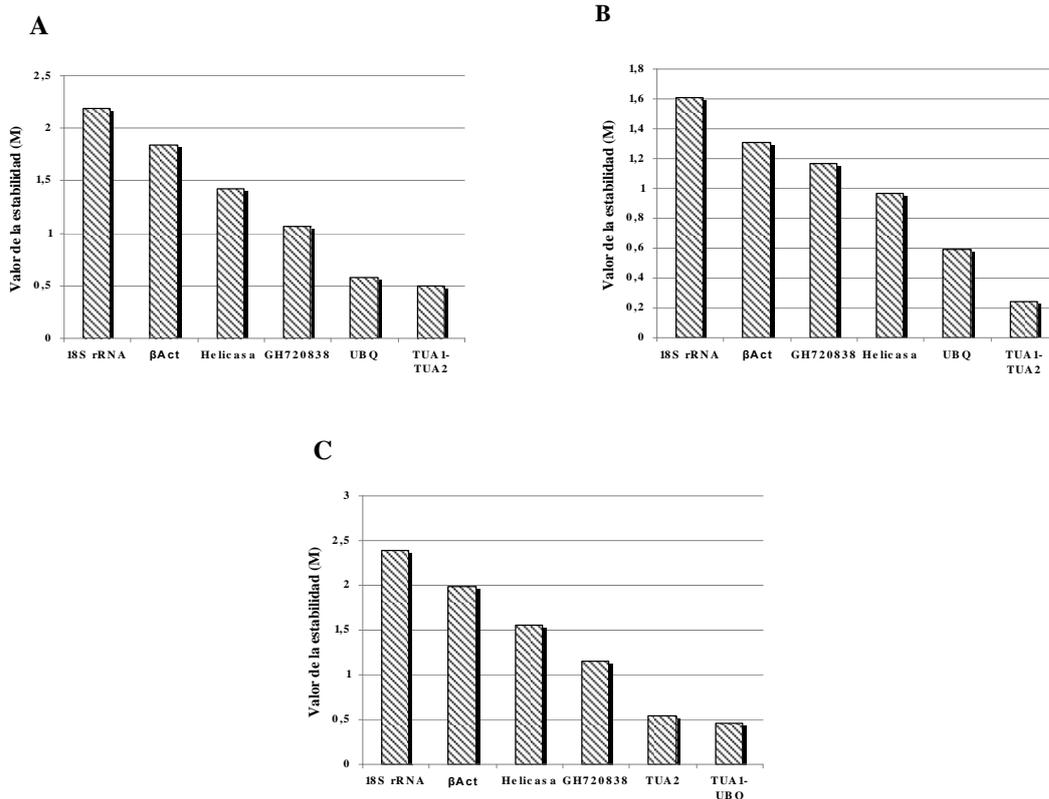
### 3.2.3. Niveles de expresión de los genes de referencia candidatos.

Los niveles de expresión de los siete genes de referencia en las diferentes muestras de cDNA se muestran en el Anexo I. Los valores de C<sub>q</sub> de los genes de referencia en todas las muestras estuvieron comprendidos entre 15,05 y 31,35 ciclos, mostrando un alto rango de variación entre estos. El gen 18S rARN fue el que mostró un valor más bajo de C<sub>q</sub>, lo que indicó los mayores niveles de expresión, seguido por TUA1 y TUA2.  $\beta$ ACT, junto con GH720838, presentaron los niveles más bajos de transcritos, mientras que UBQ y helicasa mostraron una expresión intermedia.

### 3.2.4. Estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos

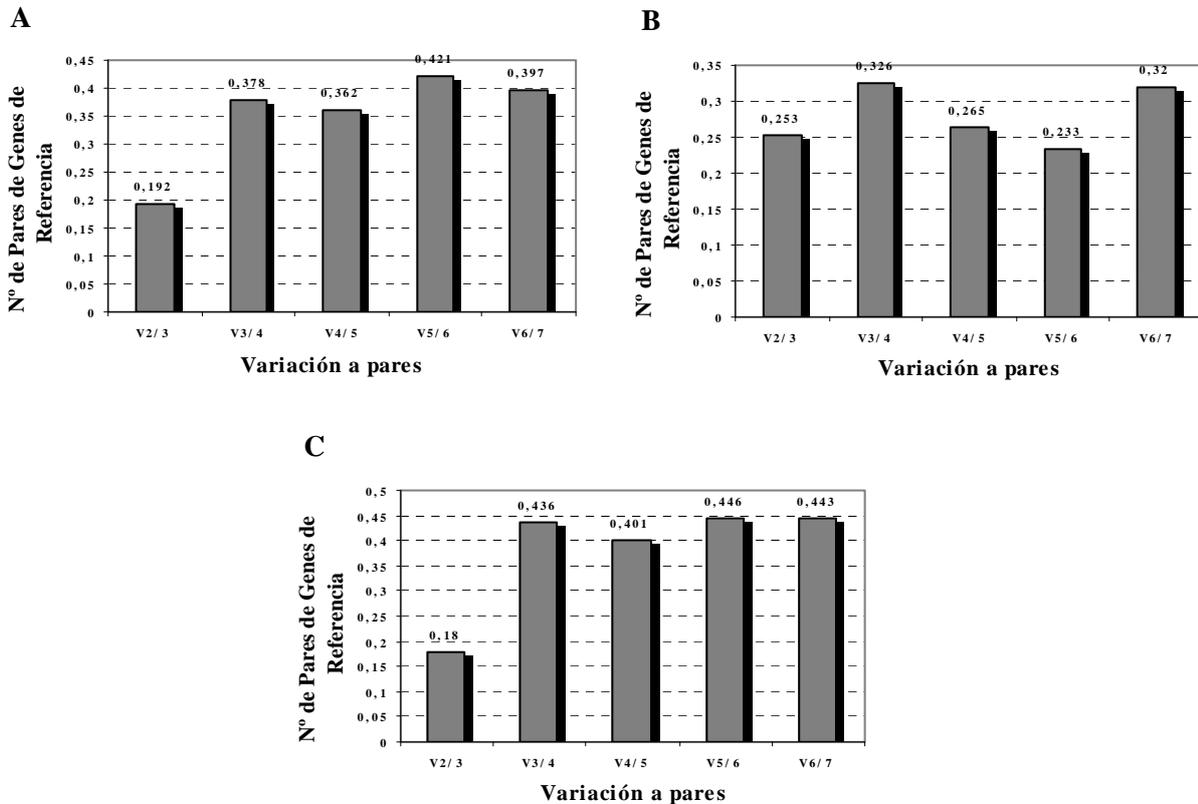
#### 3.2.4.1. Análisis con geNORM

La estabilidad de la expresión (M) de los siete genes de referencia estudiados se calculó usando la aplicación geNORM v.3.5 (Vandesompele et al., 2002). Los valores de M se analizaron tanto para el conjunto de las muestras como para las submuestras de los tratamientos y estadios de desarrollo. Cuando todas las muestras se agruparon,  $\beta$ ACT y 18S rARN mostraron valores de M superiores a 1,5 (el punto de corte establecido por geNORM), indicando que sus niveles de expresión fueron los más variables (Figura 4.A) y TUA1 y TUA2 presentaron valores de M de 0,48 sugiriendo que tenían la expresión más estable. Los resultados obtenidos para las distintas etapas de desarrollo fueron similares a los anteriores, presentando nuevamente TUA1 y TUA2 el menor valor de M (Figura 4.B). En el último grupo de muestras analizadas la expresión del 18S rARN volvió a ser la menos estable, mientras que en este caso TUA1 y UBQ fueron la pareja con el menor valor de M, indicando que se expresaron de manera estable en los distintos estreses abióticos (Figura 4.C).



**Figura 4: Valores medios de la estabilidad de la expresión, M, de los posibles genes de referencia. A) las 24 muestras incluyendo las diferentes etapas de desarrollo y los estreses abióticos; B) varias etapas de desarrollo; C) varios estreses abióticos. Los valores más bajos de M se corresponden con los genes más estables, que son los más adecuados para normalizar.**

Algunos autores han sugerido que es necesario utilizar dos o más genes de referencia en estudios de qPCR para obtener resultados precisos (Vandesompele *et al.*, 2002; Tricarico *et al.*, 2002). Cuando se incluyeron los datos de todas las muestras,  $\beta$ ACT y 18S rARN que presentaron valores de M superiores a 1,5 no fueron incluidos en el factor de normalización (Figura 4.A). El FN calculado mostró que la inclusión de un tercer, cuarto y quinto gen (GH720838, UBQ y helicasa, con valores de M <1,5) contribuyen a una mayor variación del factor de normalización ( $V_{2/3}$ ,  $V_{3/4}$  y  $V_{4/5}$ ) 0,15) (Figura 5.A) y por lo tanto, empleamos sólo dos genes (TUA1 y TUA2) cuyo valor (V) fue de 0,19, mayor de 0,15 que es el valor de corte recomendado por Vandesompele y sus colaboradores, aunque este umbral no debiera ser visto como un valor de corte demasiado estricto (manual del software geNORM). Esta situación fue similar cuando analizamos los datos obtenidos en las distintas etapas de desarrollo, presentando la  $V_{2/3}$  y  $V_{3/4}$  valores de 0,25 y 0,32, respectivamente, también superiores a 0,15 (Figura 5.B). Cuando observamos los resultados obtenidos para los distintos estreses abióticos, los valores de  $V_{2/3}$  y  $V_{3/4}$  fueron 0,18 y 0,43, lo que significaba que sólo dos genes de referencia (TUA1 y UBQ) serían suficientes para normalizar (Figura 5.C).



**Figura 5: Determinación del número óptimo de genes de referencia  $V_n/V_{n+1}$  calculado por geNORM. (A) total de muestras; (B) varias etapas de desarrollo; (C) diferentes tratamientos de estreses.**

Teniendo en cuenta todos estos resultados, con nuestro estudio se pone de manifiesto que es necesario emplear múltiples genes control y, de acuerdo con geNORM, sugerimos que sólo dos genes de referencia, TUA1-TUA2 o TUA1-UBQ, son suficientes para estudios de qPCR cuando analizamos tejidos de diferentes etapas fisiológicas y estreses abióticos en *H. coronarium*.

#### **3.2.4.2. Análisis con BestKeeper**

El programa Bestkeeper determinó un índice sólido e identificó los genes que se expresaban de forma más estable basándose en el coeficiente de correlación ( $r$ ) del IB. Según el análisis de BestKeeper, cuando las 24 muestras fueron analizadas juntas, el gen TUA1 presentó la menor variación global y 18S rARN la mayor, con desviaciones estándar de 0,28 y 2,33, respectivamente (Tabla 3).  $\beta$ ACT, helicasa, 18S rARN y GH720838 se excluyeron del análisis debido a que mostraron una alta variación de Cq. Después de estimar las relaciones entre los genes, el programa identificó a TUA1-TUA2 y TUA1-TUA2-UBQ como las combinaciones más estables según los valores de SD (0,28 en ambos casos) y mostró una fuerte correlación para estas dos combinaciones (Tabla 3), con un valor de  $p=0,001$ . Se obtuvieron resultados similares para los otros grupos de datos (Tabla 3) y en ambos casos, el algoritmo identificó a la combinación TUA1-TUA2 como la más estable. Nuestros resultados sugirieron un IB basado en la combinación de dos o tres genes, de acuerdo con Thellin et al. 1999 y Vandesompele et al. 2002, quienes propusieron por lo menos dos o tres genes de referencia como estándares internos.

Tabla 3. Análisis estadístico según BestKeeper

Todas las muestras	Genes							BestKeeper	
	<i>Act</i>	<i>TUA1</i>	<i>TUA2</i>	<i>UBQ</i>	<i>Helicasa</i>	<i>18S</i>	<i>GH720838</i>	<i>n=3</i>	<i>n=2</i>
N	24	24	24	24	24	24	24	24	24
MG (Cq)	27.36	23.03	22.83	24.78	25.63	20.48	27.61	23.53	22.93
D.E ( Cq)	2.28	<b>0.28</b>	<b>0.32</b>	<b>0.51</b>	1.6	2.33	1.18	0.28	0.28
CV (% Cq )	8.31	1.22	1.41	2.06	6.23	11.27	4.26	1.18	1.20
r Coeficiente de Pearson (n=3)		0.637	0.792	0.765					
r Coeficiente de Pearson (n=2)		0.757	0.907						
<b>Muestras de varios estreses abióticos</b>									
N	16	16	16	16	16	16	16		16
MG (Cq)	26.91	23.03	26.91	23.03	22.92	24.79	26.27		27.98
D.E ( Cq)	2.7	<b>0.24</b>	<b>0.42</b>	<b>0.52</b>	1.8	2.53	1.36		0.29
CV (% Cq )	9.96	1.04	1.81	2.11	6.84	12.3	4.87		1.24
r Coeficiente de Pearson (n=2)		0.709	0.937						
<b>Muestras de varias etapas de desarrollo</b>									
N	10	10	10	10	10	10	10		10
MG (Cq)	28.73	22.98	22.63	24.74	24.94	21.11	27.57		22.81
D.E ( Cq)	1.36	<b>0.33</b>	<b>0.17</b>	<b>0.56</b>	1.15	1.77	1.16		0.25
CV (% Cq )	4.74	1.44	0.77	2.28	4.62	8.32	4.21		1.10
r Coeficiente de Pearson (n=2)		0.982	0.929						

Nota: En las dos últimas columnas se muestra el índice BestKeeper calculado con tres genes después de eliminar la *βAct*, *Helicase*, *18S rRNA* and *GH720838* y con dos genes después de eliminar la *UBQ*. n, número de genes; MG (Cq), la media geométrica de los Cq; SD ( $\pm$  Cq), desviación estándar de los Cq; CV (%Cq), coeficiente de variación expresado como el porcentaje de los niveles de Cq; r, coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos P-valor <0.001

### 3.2.4.3. Análisis con qBase

La media del CV se calculó para las combinaciones de los genes de referencia que habían sido recomendados por los dos algoritmos anteriores, en los distintos subgrupos de muestras. Cuando todas las muestras se agruparon los valores medios del CV para los genes TUA1-TUA2 y TUA1-TUA-UBQ fueron 0,18 y 0,26, respectivamente. Estos valores estuvieron dentro del rango de  $CV \leq 0,5$  propuesto por Hellemans *et al.* 2007, como aceptable para los paneles de muestras heterogéneas. Los valores de CV también fueron inferiores a 0,5 para la combinación de genes sugeridos para las muestras de diferentes estreses abióticos y resultados similares se obtuvieron para TUA1-TUA2 (CV = 0,11) en las diferentes etapas de desarrollo.

En conclusión, las combinaciones de genes control recomendadas para los subgrupos de muestras consistirán en la combinación de los tres genes de referencia más estable (TUA1, TUA2 y UBQ) identificados por los diferentes métodos de análisis.

#### **4. DISCUSIÓN**

La exactitud en la evaluación de la expresión génica está influenciada por la cantidad y calidad del ARN de partida. La pureza y la integridad del ARN son elementos críticos para el éxito global de los análisis basados en ARN. Utilizar ARN de baja calidad podría comprometer los resultados de las aplicaciones posteriores las cuales son a menudo más laboriosas, consumen más tiempo y más caras (Raeymarkers, 1993; Imbeaud *et al.*, 2005). Es preferible usar ARN de gran calidad como punto de partida en estudios de biología molecular.

Los métodos de extracción de ARN que se usaron como el del borato sódico caliente (Wan y Wilkins, 1994) y el Trizol aplicados a los tejidos de hojas de zulla produjeron un ARN de mala calidad o fallaron en el rendimiento para ser utilizados en qPCR (Figura 1A). Esto puede deberse a que el ARN se perdió al unirse con polisacáridos, polifenoles y otros componentes durante la extracción. Utilizando el protocolo descrito en este estudio, los valores y rangos de absorbancia encontrados confirmaron que no había contaminación significativa con polisacáridos, polifenoles, sales de tampón o proteínas. También se demostró que el ARN extraído por este procedimiento era apto para una correcta amplificación en qPCR como se muestra en la Figura 2.B.

A pesar de que sólo se realizaron pequeñas modificaciones, éstas fueron clave para aislar el ARN de alta calidad requerido. Las modificaciones del método que se presentan aquí incluyen un mayor volumen de tampón de extracción y de acetato de sodio facilitando una mayor eliminación de polifenoles y polisacáridos que fueron los principales limitantes para la el aislamiento de ARN de calidad de hojas de zulla. Las demás modificaciones también contribuyeron al éxito de este procedimiento.

Este trabajo es la primera contribución a la identificación y evaluación de genes de referencia para ser utilizados en estudios de expresión génica en zulla, en particular, para análisis en qPCR.

La falta de secuencias de genes de *H. coronarium* en las bases de datos públicas nos llevó a clonar los genes de la actina, tubulina, ubiquitina, helicasa y del factor de transcripción GH720838, siendo uno de los principales obstáculos detectados al comienzo de este trabajo.

La selección de los genes de referencia se hizo en función de su uso tradicional, como controles internos en estudios de expresión en plantas (Huggett *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2006) y los nuevos genes candidatos fueron seleccionados porque previamente en especies como *Arabidopsis*

(Czechowski *et al.*, 2005), *Medicago* (Kakar *et al.*, 2008) o *Pisum sativum* (Die *et al.*, 2010) habían presentado una expresión estable.

Para determinar la estabilidad de la expresión génica y para seleccionar los mejores genes de referencia bajo ciertas condiciones experimentales, se propusieron varios enfoques. Actualmente, no hay un acuerdo sobre cual es el mejor método para evaluar la estabilidad de la expresión de los genes, por lo tanto se utilizaron varios modelos estadísticos suponiendo que una comparación con diferentes algoritmos permitiría una mejor evaluación (Tong *et al.*, 2009).

El primer método utilizado fue geNORM, que ha sido descrito recientemente como uno de los mejores métodos estadísticos para identificar genes expresados de forma estable en análisis de qPCR (Gutierrez *et al.*, 2008; Mario *et al.*, 2008) y además, este algoritmo da el número ideal de genes de referencia, que deben ser incluidos en el FN. Para todos los subgrupos de muestras el geNORM, identificó dos pares (TUA1/TUA2 y TUA1/UBQ) como los dos genes con la expresión más estable. La principal debilidad del algoritmo geNORM es su sensibilidad a la coregulación, que tiende a seleccionar los genes con el más alto grado de similitud en su perfil de expresión (Andersen *et al.*, 2004) y por lo tanto, podría dar lugar a una elección errónea de los genes óptimos para normalizar. Dentro del conjunto de genes evaluados, el par TUA1/TUA2 pertenecían a una misma familia de genes, y por lo tanto susceptibles a la coregulación. Para analizar, si en caso de haber coregulación de estos genes, ésta influía en nuestros resultados, eliminamos alternativamente uno de ellos del análisis y no se observó ninguna diferencia en estos. Esta prueba demostró que en nuestras condiciones la coregulación no influía en la clasificación de los genes de referencia más estables (Anexo II). Además, la posibilidad de que estos genes pudieran estar coregulados en este estudio era poco probable, debido a que geNORM identificó a TUA1 y UBQ como el par de genes que se expresaban de manera más estable en las muestras sometidas a diversos estreses abióticos (Figura 4.C). Con el fin de obtener resultados más precisos, la estabilidad de la expresión de cada gen de referencia también se evaluó con BestKeeper. El ranking de los tres genes más estables según lo revelado por el BestKeeper, fue idéntico al generado por geNORM. Por otra parte, cuando todas las muestras se analizaron juntas, BestKeeper detectó que los valores de correlación del índice de los tres genes (TUA1, TUA2 y UBQ) y el de TUA2 y TUA1 no eran tan similares como se esperaría si existiese coregulación (Tabla 3). De acuerdo con los resultados del software qBase, los valores de los CV calculados para los genes expresados de forma más estable, así como para la combinación de estos genes, estaban dentro del rango aceptable, lo que ayudó a garantizar la fiabilidad de los resultados presentados en esta investigación.

Los resultados obtenidos con los dos programas indicaron que TUA1, TUA2 y UBQ fueron los genes que tuvieron la menor variación en todas las condiciones experimentales evaluadas. Por otra

parte, 18S rARN y  $\beta$ ACT presentaron valores de variación altos según ambos programas, lo que indicaba que la expresión de estos genes no era estable y no debían ser usados como controles internos en estudios de expresión génica en nuestras condiciones experimentales. Se ha demostrado en estudios con álamo (Brunner *et al.*, 2004) que TUA y UBQ también mantenían una expresión estable en diferentes tejidos, pero estos mismos se identificaron como controles internos inadecuados para estudios de qPCR en varias etapas de desarrollo en *Arabidopsis* (Gutierrez *et al.*, 2008). Por otra parte, Nicot *et al.* 2005 demostraron que la ACT no sería el mejor gen para ser utilizado como referencia durante varios tratamientos en la patata, y la escasa estabilidad de la subunidad ribosomal 18S, se evidenció en tejidos de jopo (González-Verdejo *et al.*, 2008) y en melocotón (Tong *et al.*, 2009).

Según lo calculado por ambos algoritmos en este estudio, GH720838 y helicasa presentaron valores superiores de estabilidad que los dos genes de referencia tradicionales utilizados en varias especies de plantas:  $\beta$ ACT y 18S rARN (Yang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003). GH720838 y helicasa se identificaron como nuevos genes de referencia en *Arabidopsis* y *Pisum* (Czechowski *et al.*, 2005; Die *et al.*, 2010) a través de experimentos de qPCR. Así, nuestros resultados mostraron que algunos de los genes de referencia más conocidos y utilizados, con frecuencia son inadecuados para su uso en la normalización de datos en qPCR de tejidos de zulla y que no hay genes de referencia generales para todas las especies vegetales.

Por lo tanto, el primer paso en los estudios de expresión génica es una validación preliminar de los genes de referencia en las condiciones experimentales específicas.

Se observaron algunas diferencias entre los análisis realizados por geNORM y BestKeeper en el número de genes propuestos para normalizar en nuestras condiciones experimentales. Cuando todas las muestras se agruparon, la combinación TUA1/TUA2 fue identificada por geNORM y BestKeeper como la mejor combinación de dos genes, y este último también sugirió como mejor combinación la formada por tres genes, TUA1/TUA2/UBQ. Al analizar los resultados obtenidos con BestKeeper, pudimos deducir que el índice de tres genes (TUA1/TUA2/UBQ) no introduciría más variación que el índice de dos genes, ya que el valor de la SD en ambos casos fue de 0,28 y además, el CV de los valores de Cq con tres genes fue menor que el de dos genes (TUA1/TUA2) (Tabla 3). Por lo tanto, un índice de normalización ideal sería el formado por TUA1/TUA2/UBQ. Estos resultados concuerdan con Vandesompele *et al.* (2002), quienes propusieron un número mínimo de tres controles internos como el número ideal de genes de referencia para normalizar.

En el subgrupo de las muestras sometidas a estrés abiótico, también se observaron diferencias en los resultados según el algoritmo utilizado. En este caso, los genes de referencia identificados por geNORM fueron UBQ/TUA1, mientras que Bestkeeper identificó a TUA1/TUA2. En el caso de las

muestras de diferentes etapas de desarrollo, los dos algoritmos dieron resultados similares (TUA1/TUA2).

## 5. REFERENCIAS

- Abrahams-Salaam F., 2008. A Molecular Investigation Of A Mixed Ancestry Family Displaying Dementia And Movement Disorders. Tesis Doctoral. University of Stellenbosch, South Africa.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets, *Cancer Res.* 64: 5245–5250.
- BestKeeper Software Manual Update, <<http://gene-quantification.com/bestkeeper.html#download>>.
- Brunner, A.M., Yakovlev, I.A., Strauss, S.H., 2004. Validating internal control for quantitative plant gene expression studies, *BMC Plant Biol.*, 4: 14.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Reinhold Mueller, R., et al., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.*, 55 (4): 611-622.
- Coker, J.S., Davies, E., 2003. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data, *BioTechniques.* 35: 740-748.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.R., 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 139: 5–17.
- Die, J.V., Román, B., Nadal, S., González-Verdejo, C.I., 2010. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions, *Planta* 232: 145–153.
- Faccioli, P., Ciceri, G.P., Provero, P., Stanca, A.M., Morcia, C., Terzi, V., 2007. A combined strategy of “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies. *Plant Mol. Biol.*, 63: 679-688.
- Fernandez, P., Di Rienzo, J., Fernandez, L., Esteban Hopp, H., Paniego, N., Heinz, R.A., 2008. Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarrays analysis. *BMC Plant Biol.*, 8: 11.
- Fox, D., 1998. Measuring absorbance of RNA samples. *Focus*, 2.
- Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B., 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. *J Exp Bot.*, 55: 1445-1454.
- geNorm Software Manual Update, <<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>>.
- González-Verdejo, C.I., Die, J.V., Nadal, S., Jiménez-Marín, A., Moreno, M.T., Roman, B., 2008. Selection of housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR: analysis of Or-MYB1 gene expression in *Orobanche ramose* development, *Anal. Biochem.*, 379: 38–43.

- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L., 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J. Exp Bot.*, 60(2): 487-493.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C., Van Wuytswinkel, O., 2008. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants, *Plant Biotechnol.*, 6: 609-618.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data, *Genome Biol.* 8, R19.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. *The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*, Circular 347, California Agriculture Experiment Station, Berkeley, pp. 1-39.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations, *Genes Immun.* 6 : 279-284.
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O., Schroeder, A., Auffray, C., 2005. Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.*, 33(6): e56.
- Kakar, K., Wandrey, M., Czechowski, T., Gaertner, T., Scheible, W-R., Stitt, M., Torres-Jerez, I., 2008. A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant Methods*, 4: 18.
- Kim, B-R., Nam, H-Y., Kim, S-U., Kim, S-I., Chang, Y-J., 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice, *Biotechnol. Lett.* 25: 1869-1872.
- Lee, P.D., Sladek, R., Greenwood, C.M.T., Hudson, T.J., 2001. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res.*, 12 (2): 92-297.
- Loomis, W.D., 1974. Overcoming problems of phenolic and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles, *Meth. Enzymol.*, 31: 528-545.
- Louime, C., Vasanthaiah Hemanth, K.N., Jittayasothorn, Y., Lu, J., Basha, S.M., Thipyapong, P., Boonkerd, N., 2008. A simple and efficient protocol for high quality RNA extraction and cloning of chalcone synthase partial cds from muscadine grape cultivars (*Vitis Rotundifolia* Michx), *Eur J Sci Res.*, 22: 232-240.
- Manchester, K.L., 1996. Use of UV methods for the measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, 20: 968-970.
- Mario, E.R., Borges, A.A., Perez, A.B., Perez, J.A., 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process, *BMC Mol. Biol.* 8: 131.
- Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, *J. Exp. Bot.*, 56: 2907-2914.
- Paolacci, A., Tanzarella, O., Porceddu, E., Ciaffi, M., 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat, *BMC Mol. Biol.* 10(1): 11.

- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnology*, 26: 509–515.
- Pfaffl, M.W., 2010. The road from qualitative to quantitative assay: What is next?. En: *The PCR Revolution. Basic Technologies and Applications.* (Ed.) Bustin, S.A.. University of London pp 110-128.
- Puthoff, D.P., Nettleton, D., Rodermeil, S.R., Baum, T.J., 2003. *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J.*, 33: 911-921.
- Pugniere, P., Banzet, S., Chaillou, T., Mouret, C., Peinnequin, A., 2011. Pitfalls of RT-qPCR standardization: volume-related inhibitors of reverse transcription. *Analytical Biochemistry*, 415 (2): 151-157.
- Raeymarkers, L., 1993. Quantitative PCR: theoretical consideration with practical implication. *Anal. Biochem.*, 214: 582-585.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT–PCR during berry development, *BMC Plant Biol.* 6: 27.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Selvey, S., Thompson, E.W., Matthaei, K., Lea, R.A., Irving, M.G., Griffiths, L.R., 2001. Beta-actin an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol. Cell Probes.*, 15: 307-311.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R., 2000. Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29: 332-337.
- Tichopad, A., Bar, T., Pecen, L., Kitchen, R.R., Kubista, M., Pfaffl, M.W., 2010. Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods*, 50 (4): 308-312.
- Tichopad, A., Kitchen, R., Riedmaier, I., Becker, C., Stahlberg, A., Kubista, M., 2009. Design and Optimization of Reverse-Transcription Quantitative PCR Experiments. *Clin Chem.*, 55 (10): 1816.
- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., Zhang, Z., 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR, *BMC Plant Biol.* 10: 71.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., 1999. Housekeeping genes internal standards: use and limits, *J. Biotechnol.*, 75: 291–295.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distanti, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., Orlando, C., 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies, *Anal. Biochem.*, 309: 293–300.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real time quantitative RT–PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, 3 RESEARCH0034.

- Vandesompele, J., Kubista, M., Pfaffl, M.W., 2009. Reference gene validation software for improved normalization, en: J. Logan, K. Edwards, N. Saunders (Eds.), *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Caister Academic Press, Norwich, UK, pp. 47–64.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M., 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44: 619-626.
- Wan, C.Y., Wilkins, T.A., 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem.*, 223: 7-12.
- Yang, Y., Hou, S., Cui, G., Chen, S., Wei, J., Huang, L., 2010. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza*, *Mol. Biol. Rep.* 37: 507–513.

## CAPÍTULO VI

---

Mejora genética de *Hedysarum coronarium* L.



## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de variedades mejoradas de plantas se fundamenta en la disponibilidad y aprovechamiento de la diversidad genética, en los criterios de selección de fuentes de germoplasma y en el conocimiento y la aplicación correcta de las metodologías de mejora (Márquez, 1988).

Como se indicó en la Introducción, las especies cuyo modo de reproducción es predominantemente alógamo deben mantener altos niveles de heterosis, y así se deberá tener en cuenta cuando se diseñen los programas de mejora. Algunas especies son autocompatibles y por lo tanto pueden ser autofecundadas; otras tienen autoincompatibilidad muy pronunciada. Existen también diferencias pronunciadas en los efectos de la autofecundación, que puede ser desde muy poca o ninguna degeneración en algunas plantas a producir efectos drásticos en otras. Como resultado de esta diversidad entre las distintas especies, los métodos de mejora de plantas alógamas no se pueden agrupar tan nítidamente como los métodos utilizados en las especies autógamas. Los métodos más importantes que se aplican en las especies de fecundación cruzada son la selección masal, retrocruzamiento, hibridación de líneas puras o de otra clase de material apto para formar variedades híbridas, selección recurrente y la formación de variedades sintéticas a partir de poblaciones seleccionadas.

La dificultad que presentan los cruzamientos dirigidos o hibridaciones de líneas de *Hedysarum coronarium* L. y que en la Literatura se hace referencia a “Variedades Sintéticas” como método de obtención de variedades de zulla [Grimaldi (Boller *et al.*, 2010), Moonbi y Wilpena (Lloyd, 2006)], fue lo que llevó a plantear como objetivo el desarrollo de una nueva población utilizando el método de variedades sintéticas, aprovechando la aptitud combinatoria específica y utilizando el criterio de alto porcentaje de semilla blanda.

Las variedades sintéticas (VS) son variedades que se mantienen por semilla de polinización abierta después de su síntesis por hibridación en todas las combinaciones entre un número de genotipos seleccionados (Allard, 1967). Los genotipos que se hibridan para producir una variedad sintética pueden ser líneas puras, clones, poblaciones en las que se ha realizado selección masal u otros materiales. Éstos se polinizan libremente en aislamiento para evitar la llegada de polen extraño, y se multiplican las generaciones sucesivas asimismo en aislamiento. Se forma, pues, una nueva población inexistente hasta entonces, caracterizada por las líneas fundadoras y de cuyas características podremos siempre estar seguros ya que la podemos reproducir comercialmente idéntica a sí misma sin más que mezclar las mismas líneas puras y repetir el proceso de multiplicación en el mismo ambiente.

Una VS se sinteriza con genotipos cuya aptitud combinatoria ha sido ensayada. Sólo los genotipos que se combinan bien entre sí en todas las combinaciones entran en la variedad sintética. Para determinar la aptitud combinatoria de los diferentes genotipos pueden usarse muchos procedimientos diferentes. Estos procedimientos varían desde la simple inspección visual buscando los caracteres muy heredables, a los ensayos de rendimiento potencial como criterio primario de selección por los caracteres complejos.

En este trabajo, el proceso desarrollado para obtener nuevas líneas de *H. coronarium* estables, con un mayor porcentaje de semilla blanda y de mejores rendimientos de forraje adaptadas a nuevas zonas productoras potenciales de Andalucía, comenzó con la selección de los parentales que producirían la nueva línea de zulla. Los ecotipos *Hc-3* y *Hc-26* se seleccionaron por presentar una mayor proporción de semillas blandas, cualidad importante en esta especie, para reducir el coste de las semillas, y carácter heredable según manifestaron Miles *et al.* (1997) y Argel y Paton (1999). A continuación estos ecotipos se cruzaron libremente en aislamiento para evitar la llegada de polen extraño, se multiplicaron y se evaluaron para los caracteres de interés.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Criterios de Mejora**

Para seleccionar las poblaciones a partir de las cuales se iniciaría el programa de mejora de esta especie, se evaluaron algunos de los genotipos que formaban parte de nuestra colección de trabajo para la proporción de semillas duras (semillas con la cubierta impermeable) y blandas. El desarrollo de genotipos de semilla blanda es una de las características buscadas por los investigadores australianos, unos de los pioneros en el desarrollo de nuevos cultivares de zulla. Esta característica permitiría sembrar directamente las semillas sin descascarillar, lo que disminuiría el precio de estas y se eliminaría uno de las mayores limitantes para la implantación de esta especie.

Basándonos en el modo de reproducción de *H. coronarium* se estableció un método de mejora apropiado para especies predominantemente alógamas que junto con la presión de selección de los ambientes seleccionados determinaron la estructura genética de la nueva población.

## **2.2. Material Vegetal.**

El material vegetal utilizado para evaluar la proporción de semillas duras y blandas fueron 14 poblaciones de zulla que formaban parte de nuestra colección de trabajo (*Hc-3, Hc-4, Hc-6, Hc-9, Hc-10, Hc-11, Hc-12, Hc-13, Hc-14, Hc-15, Hc-16, Hc-26, Hc-30* y *Hc-33*) y tres variedades comerciales (Carmen, Del País y Grimaldi) usadas como testigos. Los datos de pasaporte de las poblaciones recolectadas se presentan en la Tabla 1 de Capítulo I (página 50). La población *Hc-26* fue recogida en la finca experimental del IFAPA Centro “Las Torres-Tomejil”

Para el desarrollo de la nueva población de zulla se seleccionaron los genotipos *Hc-3* y *Hc-26* por presentar una menor proporción de semillas duras en el ensayo anterior.

## **2.3. Metodología**

### **2.3.1. Selección de líneas de semilla blanda.**

Para la primera evaluación, de cada población/variedad de zulla se tomaron 10 individuos al azar y de cada individuo 10 semillas para evaluar la germinación tanto de semillas desnudas (descascarilladas) como de semillas vestidas, según un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

Las semillas desnudas y las vestidas se colocaron sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, en placas petri de 12x12 cm y se mantuvieron a una temperatura constante de germinación de 15 °C, y a un régimen de 12 horas luz y 12 horas noche (Ewing *et al.*, 2006).

Paralelamente se contaron las semillas germinadas a los 4, 7 y 14 días según el criterio acordado por la International Seed Testing Association.

### **2.3.2. Método de mejora**

Para desarrollar la nueva población de zulla, de las poblaciones 3 y 26 se tomaron trescientas semillas, se esterilizaron en 3,5 % de hipoclorito sódico durante 10 minutos y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril. En el mes de diciembre del 2007 las semillas se sembraron en bandejas de alveolos de plástico flexible en el invernadero del IFAPA Centro “Alameda del Obispo”, obteniendo 104 y 167 plántulas por genotipo (*Hc-26* y *Hc-3*, respectivamente) (Figura 1). En el mes de marzo del 2008 se trasplantaron 90 plantas de cada genotipo ( $P_0$ ) a una parcela experimental de dimensiones 36x4 m, formada por 5 surcos de 36 plantas. El marco de plantación utilizado fue de 1x1 m, disponiendo las

plantas de forma que cada genotipo estuviera rodeado de plantas del otro genotipo, forzando así el cruzamiento entre las dos poblaciones (Figura 2).

Previamente se realizó la preparación del terreno consistiendo en una labranza convencional y la instalación de riego por goteo en la parcela experimental con objeto de favorecer el cultivo y así los cruzamientos entre las dos líneas.



Figura 1: Plántulas de zulla germinadas en bandejas de alveolos de plástico en el invernadero

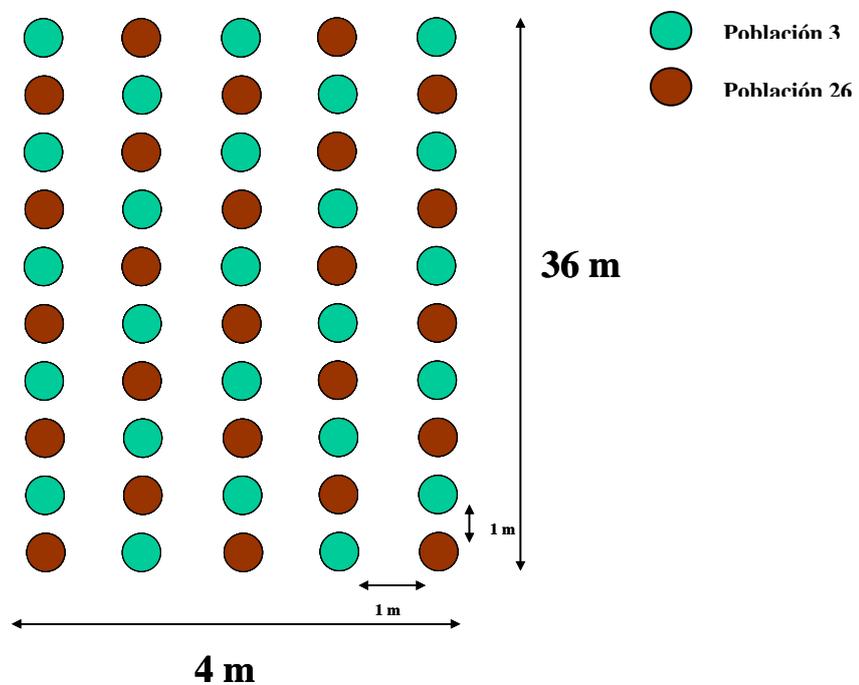
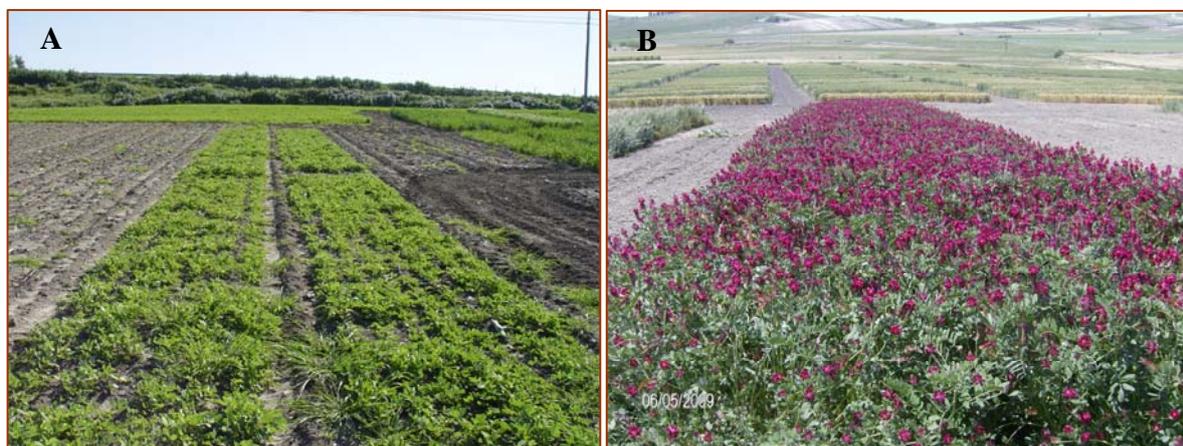


Figura 2: Marco de plantación utilizado para formar la nueva población de *Hedysarum coronarium*.

A finales de junio de 2008 se llevó a cabo la recolección de las vainas haciéndose en todos los casos separadamente planta a planta y posteriormente fueron trilladas en el laboratorio para obtener las semillas. La producción de semillas (g) de cada una de las plantas se presentan en el Anexo III.

Para el desarrollo de la nueva población, se realizó una mezcla equilibrada de las semillas de las plantas individuales de los genotipos recogidos en la campaña anterior, que tuvieron suficientes semillas (3 g). De esta mezcla de semillas se formaron tres poblaciones iguales ( $P_1$ ) (150 g) para ser llevadas a cultivo en condiciones de polinización abierta en presencia de polinizadores naturales en la campaña 2008/09. Cada una de estas poblaciones se sembró en tres localidades diferentes: (1) en Jerez de la Frontera en la finca experimental del IFAPA Centro “Rancho de la Merced”, el 25 de noviembre de 2008 (2) en Carmona en la finca experimental del IFAPA Centro “Las Torres-Tomejil”, el 28 de noviembre de 2008 y (3) en Córdoba en la finca experimental del IFAPA Centro “Alameda del Obispo”, el 19 de diciembre de 2008. La dosis de siembra utilizada fue 35 kg/ha y el tamaño de las parcelas de 10x4,2 m, formadas por 21 surcos separados entre si 0,2 m (Figura 3.A). Estas se establecieron en zonas aisladas de cualquier otra fuente de polen de zulla para evitar la contaminación (Figura 3.B).



**Figura 3: Parcela de zulla establecida en el IFAPA Centro “Rancho de la Merced”. (A) Zulla en las primeras etapas del estado vegetativo. (B) Zulla en floración.**

A finales de junio de 2009 se recolectaron las vainas sin selección alguna de la parcela situada en la localidad de Jerez (Cádiz). Las parcelas establecidas en las otras dos localidades se malograron, omitiéndolas del ensayo. En la localidad de Córdoba las elevadas precipitaciones registradas en los

meses posteriores a su establecimiento y en la localidad de Carmona (Sevilla) las precipitaciones junto a factores edáficos, repercutieron notoriamente en la buena implantación del cultivo confluendo en la pérdida de éste.

Una vez el material recogido, se procedió al trillado de sus vainas para la obtención de las semillas de la nueva población ( $P_2$ ) y se almacenaron hasta su uso en la campaña siguiente.

En la campaña 2009/10 la nueva población obtenida fue evaluada para estudiar la proporción de semillas blandas, criterio de mejora adoptado para la elección de los parentales de la  $P_0$  y su potencial como planta forrajera en la localidad de Jerez. Para determinar la cantidad de semillas blandas se tomaron 200 semillas descascarilladas de la  $P_2$  y el procedimiento utilizado fue el descrito anteriormente. Los ensayos comparativos de producción se establecieron junto a otras poblaciones de zulla recolectadas en la provincia de Cádiz y Sicilia (Italia) y variedades comerciales como testigos de rendimiento. La evaluación de estos ensayos se estudió en el Capítulo II.

Además en esta campaña se estableció una parcela con  $P_2$  para avanzar en la generación. Las dimensiones de la parcela fueron de 40x15 m y se utilizaron 25 kg/ha como dosis de siembra. Como en los casos anteriores la parcela se situó en una zona aislada para evitar posibles contaminaciones y en una zona alta para impedir los posibles problemas de encharcamiento que pudieran provocar las elevadas precipitaciones. En junio de 2010 se procedió a la recolección de las vainas, trillado y posterior acondicionamiento de las semillas ( $P_3$ ) para su uso en la campaña siguiente.

En la campaña 2010/11, se volvió a evaluar uno de los ensayos comparativos establecidos en la campaña anterior, correspondiendo éste al segundo año del cultivo. También se estableció una parcela de multiplicación con las semillas  $P_3$  para seguir avanzando en la generación. La recolección de esta parcela se realizó en junio de 2011. Las vainas fueron trilladas para la obtención de las semillas ( $P_4$ ) y se acondicionaron para su uso en años posteriores.

El régimen de precipitación y temperatura media de cada uno de los años agrícolas se recogen en el Anexo IV.

El esquema seguido en el desarrollo de la nueva población de zulla es el que se muestra en la Figura 4.

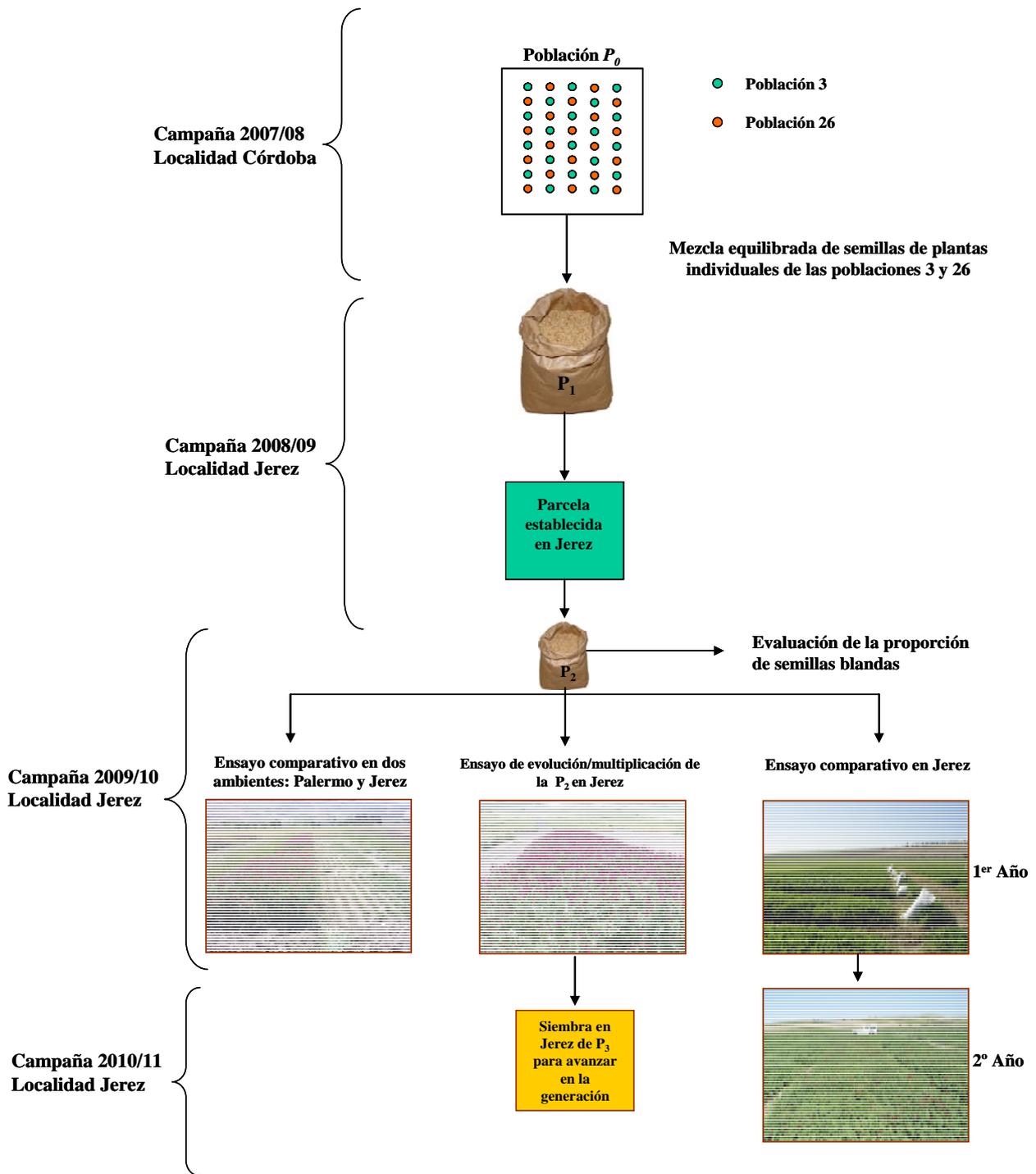


Figura 4: Esquema seguido en el desarrollo de la nueva población de zulla

## **2.4. Análisis estadísticos**

Con los datos de germinación obtenidos a los 4, 7 y 14 días, se realizó el análisis de la varianza según el diseño anteriormente expuesto y la comparación de medias entre poblaciones se estudió mediante el método de la mínima diferencia significativa (M.D.S.) al nivel de significación  $P < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Selección de poblaciones de mayor proporción de semilla blanda y de germinación de semilla vestida.**

En la Tabla 1 se muestran los valores medios obtenidos para el porcentaje de germinación tanto de semillas descascarilladas como sin descascarillar de las distintas poblaciones/variedades ensayadas.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre las poblaciones para la germinación a los cuatro, siete y catorce días. En el ensayo con la semilla descascarillada, se identificaron cuatro poblaciones (*Hc-3*, *Hc-6*, *Hc-26* y *Hc-30*) con altos valores medios de germinación, valores muy superiores al resto de poblaciones evaluadas y similares a los obtenidos en las variedades comerciales, que las sitúa ventajosamente sobre los demás genotipos por su mayor adaptación en sus entornos específicos. Sin embargo, en el ensayo realizado con la semilla sin descascarillar, los valores medios obtenidos son muy reducidos, alcanzado solamente la población *Hc-26* valores en torno al 7%, valor que casi dobla a los obtenidos por las variedades comerciales (Tabla 1). La *Hc-3* también presentó valores elevados de germinación en torno al 5 %, superior al resto de poblaciones/variedades evaluadas (Tabla 1).

**Tabla 1: Valores medios de germinación de semillas descascarilladas y sin descascarillar de diferentes poblaciones/variedades de *Hedysarum coronarium L.***

Población/variedad	Semillas descascarilladas (% germinación)			Semillas sin descascarillar (% germinación)		
	4 días	7 días	14 días	4 días	7 días	14 días
<b><i>Hc-3</i></b>	21,3±3,9	23±3,8	24,3±4,1	2,3±1,2	4,6±2,1	5,3±2,1
<b><i>Hc-4</i></b>	0,6±0,4	2,6±0,9	7,6±1,6	0±0	0,3±0,3	1,3±0,6
<b><i>Hc-6</i></b>	8±2,5	10±2,5	24±2,6	0±0	0,3±0,3	0,3±0,3
<b><i>Hc-9</i></b>	0,6±0,4	3±0,9	5±1,4	0±0	0,3±0,3	1,3±0,6
<b><i>Hc-10</i></b>	3,3±0,9	4,6±1,04	9,6±1,5	0±0	0±0	0,6±0,6
<b><i>Hc-11</i></b>	2±0,7	4,3±1,2	11±1,8	0,3±0,3	0,6±0,4	1±0,5
<b><i>Hc-12</i></b>	0±0	2,3±0,9	6,6±1,6	0±0	0,3±0,3	0,3±0,3
<b><i>Hc-13</i></b>	0,6±0,4	5±1,1	16,3±2,4	0±0	0,3±0,3	0,6±0,4
<b><i>Hc-14</i></b>	0±0	2,6±0,9	8,3±1,5	0,3±0,3	1,3±0,6	1,3±0,6
<b><i>Hc-15</i></b>	6±1,4	8,3±1,6	12,6±1,8	1±0,5	3,3±0,9	3,6±1,0
<b><i>Hc-16</i></b>	5±1,5	6±1,7	8±2	1,6±0,6	2±0,7	3,6±1,0
<b><i>Hc-26</i></b>	19±3,4	26,3±3,8	31±3,9	1±0,7	5,3±1,6	7,6±1,8
<b><i>Hc-30</i></b>	18,3±4,5	20±4,8	21,3±5,1	1,6±0,8	2±0,8	2,6±0,9
<b><i>Hc-33</i></b>	4±1,2	5,3±1,4	7,3±1,8	0,3±0,3	0,6±0,4	0,6±0,4
<b>Del País cv.</b>	10,3±2,4	22,3±3,1	30,6±3,0	0,3±0,3	3,3±0,8	4,3±1,0
<b>Grimaldi cv.</b>	16,3±2,8	24,3±3,2	28,6±3,4	0,6±0,4	3,3±1,1	4,3±1,1
<b>Carmen cv.</b>	15±1,6	21±2,2	22,3±2,3	0±0	3,6±1,3	4±1,3
<b>M.D.S. (5 %)</b>	<b>5,8</b>	<b>6,5</b>	<b>7,0</b>	<b>2,2</b>	<b>3,6</b>	<b>4,1</b>

**Nota: MDS: mínima diferencia significativa al nivel de significación  $p < 0,05$ .**

A partir de los resultados obtenidos seleccionamos las poblaciones 3 y 26 para desarrollar la nueva población de *H. coronarium*.

### 3.2. Resultados del proceso de desarrollo de la nueva población

En la primera campaña la producción de semillas obtenidas por cada una de las plantas de los genotipos 3 y 26 se presentan en el Anexo III. En la Tabla 2 se muestran las semillas totales obtenidas por las dos poblaciones, mostrando la *Hc-26* el 66 % más de producción que la *Hc-3*.

**Tabla 2: Producción de semilla (g) de las poblaciones 26 y 3 en la campaña 2007/08**

<b>Población</b>	<b>Producción de semilla (g)</b>
<i>Hc-26</i>	2.389,3
<i>Hc-3</i>	904,8

Al mezclar un número igual de semillas de cada una de las plantas individuales de las poblaciones 3 y 26, obtuvimos la P<sub>1</sub> formada por 450 g de semillas. Esta población la dividimos en tres partes iguales de 150 g y establecimos una parcela por localidad en tres ambientes diferentes.

En la campaña 2008/09 se recolectó la producción de la parcela situada en Jerez obteniendo un total de 2 kg de semillas. Estas semillas fueron las que formaron la P<sub>2</sub> (denominada Córdoba), la cual se incluyó en ensayos comparativos de producción con otras poblaciones y variedades de zulla y además se le evaluó el porcentaje de semillas blandas. En la Tabla 3, se muestran los valores medios de germinación obtenidos a los 4, 7 y 14 días, observándose porcentajes muy elevados del 71 %.

**Tabla 3: Valores medios de germinación de semillas descascarilladas de la línea Córdoba.**

<b>Línea</b>	<b>Semillas descascarilladas (% germinación)</b>		
	<b>4 días</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>
<b>Córdoba</b>	56,5±3,85	63,5±3,42	71±3,15

En la Tabla 1 y 4 del Capítulo II, se presentan los valores medios de producción (2009/10 y 2010/11) obtenidos por la línea Córdoba en comparación con las variedades Del País y Carmen y con poblaciones espontáneas recolectadas en la zona de Andalucía Occidental.

En el primer año del cultivo, una de las variedades testigo, el Carmen cv. dio unas producciones medias de 28.394 kg/ha y 2.855,9 kg/ha de forraje verde (FV) y rendimiento de materia seca (RMS) respectivamente, inferiores a las obtenidas por la línea Córdoba (30.278 kg FV/ha y 3.093,3 kg MS/ha). En cambio, la variedad Del País mostró unas producciones de FV y RMS en torno al 23,26 y 21 % superiores. Comparada con las poblaciones de zulla espontáneas, los valores de producción obtenidos por la línea Córdoba fueron de los mayores (Tabla 1, Capítulo II)

En el segundo año del ensayo los resultados no mostraron diferencias significativas para la producción de FV y RMS en las poblaciones evaluadas. A pesar de esto, la línea Córdoba fue la que obtuvo una mayor producción 44.782 kg FV/ha y 4.578 kg MS/ha, incluso superior a la de los testigos Carmen (34.478 kg FV/ha y 3.622 kg MS/ha) y Del País (36.470 kg FV/ha y 3.861 kg MS/ha).

En un segundo ensayo establecido en dos ambientes diferentes, Palermo (Sicilia) y Jerez (Cádiz), también se incluyó la línea Córdoba para evaluar su potencial como forrajera y compararla con poblaciones sicilianas. El estudio detallado de este ensayo se muestra en el Capítulo II.

En este caso, en las condiciones de Jerez, la línea Córdoba junto con las variedades comerciales Carmen y Grimaldi formaron el grupo de mayor producción de forraje verde, siendo superior a la variedad S. Omero y a las poblaciones Gangi y *Hc-11*. Para el RMS, después de las variedades Carmen y Grimaldi fue la que más produjo (Figura 5 y 6 del Capítulo II).

En las condiciones de Palermo, formó parte del grupo de mayor producción de FV junto a las variedades comerciales y para kg MS/ha fue la que más produjo (Figura 5 y 6 del Capítulo II).

#### **4. DISCUSIÓN**

Una de las nuevas líneas de investigación desarrolladas en Australia Occidental en la especie *Hedysarum coronarium* L. es la destinada a la obtención de genotipos de semilla blanda, los cuales no necesitarían descascarillado y contribuirían a reducir el coste de las semillas (Moore *et al.*, 2006). Aunque la dureza de las semillas puede estar influenciada por las condiciones ambientales, por ejemplo el estrés hídrico y en el caso de las semillas de zulla por diversos “mecanismos” (físicos y químicos) de dormancia que evitan su germinación masiva (San Miguel, 2007), también se ha señalado que es un carácter heredable no pudiéndose excluir el efecto de variaciones genéticas intraespecíficas, ya que se ha mostrado que existen evidencias relativas a caracteres cuantitativos, entre los cuales se menciona la dureza de las semillas (Miles *et al.*, 1997; Argel y Paton, 1999).

Normalmente la zulla convencional produce un alta cantidad de semillas duras, semillas con la cubierta impermeable, que son capaces de sobrevivir campañas de cultivo especialmente en ambientes caracterizados por lluvias imprevisibles en cantidad y distribución, logrando la persistencia de la leguminosa en condiciones silvestres (Taylor y Ewing, 1988; Sulas *et al.*, 1999). Bajo condiciones de domesticación y para su uso como planta forrajera, esta cualidad no es deseable, obligando al agricultor a aumentar la dosis de siembra hasta valores exagerados, con objeto de asegurar una mínima nascencia e

implantación en el terreno. A esto se une la necesidad de extraer las semillas de las vainas y escarificarlas para una mayor germinación. La dificultad del descascarado de la zulla incide en la *cuasi* obligación del agricultor a comprar la semilla, ya que no puede por cuestiones técnicas realizar dicha operación en su explotación, teniendo que pagar un alto precio por las semillas. Desarrollar genotipos con niveles muy bajos de semillas duras en las vainas evitaría la necesidad del descascarado y la escarificación, permitiendo la siembra directa de las vainas. Esta estrategia ha sido muy eficaz en serradela rosada (*Ornitophus sativus*) siendo una de las principales razones de la rápida y generalizada aceptación de este cultivo como especie forrajera.

Por lo tanto un primer objetivo a la hora de hacer mejora en la especie para su uso como planta productora de forraje será el de seleccionar genotipos con alta proporción de semilla blanda, fácilmente germinable, dando un paso más si se consiguen líneas de alto valor de germinación con semilla sin descascarillar.

Con estas premisas, se planteó evaluar en las poblaciones silvestres recolectadas, la proporción de semillas blandas y duras, estudiando su germinación con las semillas descascarilladas y sin descascarillar (con vaina). El fin último fue seleccionar aquellos genotipos con alto valor de germinación, lo cual implicaba una mayor proporción de semillas blandas producidas, para ser incorporados en el programa de mejora de la especie.

Los resultados obtenidos identificaron a las poblaciones 3 y 26 con la mayor proporción de semillas blandas y fueron incluidas en el programa de mejora para el desarrollo de una nueva población de zulla.

Los ensayos comparativos llevados a cabo en la localidad de Jerez demuestran que la nueva población de zulla desarrollada durante esta Tesis, es similar a las poblaciones actuales o superior, en diversos aspectos. Se pone de manifiesto, por tanto, que la flora espontánea o cultivada local o nacional tiene, para el proceso de selección y mejora de las especies pratenses y forrajeras, una importancia capital. Debe prestársele, por esta razón, la máxima atención.

Por otra parte, la evaluación llevada a cabo en la P<sub>2</sub> para determinar la proporción de semillas blandas, uno de los caracteres de interés buscado en esta nueva línea, también nos mostró su superioridad en este aspecto. La germinación que presentó fue muy superior al resto de las poblaciones de zulla evaluadas en el ensayo anterior e incluso a los parentales *Hc-3* y *Hc-26* que fueron seleccionados para desarrollar esta línea (Tabla 1 y 3). La germinación de los parentales (*Hc-3* y *Hc-26*)

a los catorce días fue de 24,3 y 31 % respectivamente, habiéndose conseguido casi triplicar este aspecto en la línea Córdoba.

Hasta la fecha se ha obtenido una población de zulla muy prometedora y se espera seguir con el programa de mejora de la especie, en los próximos años, hasta llegar a alcanzar poblaciones perfectamente adaptada a las condiciones de Jerez que puedan dar las máximas producciones de forraje de la mejor calidad.

## 5. REFERENCIAS

- Allard, R.W., 1967. Principios de Mejora Vegetal. Ed. Omega S. A. Barcelona.
- Argel, P.J., Paton, C.J., 1999. Overcoming legume hardseededness. En: Forage Seed Production. Volume 2: Tropical and Subtropical Species. (Eds.) Loch, D.S., Ferguson, J.E., CAB Pub. Wallingford, UK. pp 247 – 265.
- Boller, B., 2010. Handbook of plant breeding. En: Fodder crops and amenity grasses. (Eds) Boller, B., Posselt, U.K., Veronesi, F. pp 523.
- Ewing, M., Wing, M., WING, M., Foster, K., Skinner, P., Nichols, P., Nutt, B., Snowball, R., Beatty, R., 2006. Sulla and Purple Clover as Fodders - Limits on Seed Production. RIRDC Publication N° 06/049. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra.
- Lloyd, D., 2006. Sulla - a new short-term perennial legume. Ground Cover Issue 62 - Pastures Supplement.
- Márquez, S.F., 1988. Genotecnia Vegetal: Métodos Teoría Resultados. Tomos II. AGT Editar. pp 360-479.
- Moore, G., Sanford, P., Wiley, T., 2006. Perennial pastures for Western Australia, Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.
- Miles, J.W., Clements, R.J., Grof, B., Serpa, A., 1997. Genética y mejoramiento de Centrosema. En: Centrosema: Biología, Agronomía y Utilización.. (Eds.) Schultze-Kraft, R., Clements, R.J., Keller-Grein, G., CIAT. Publicación N° 238. Colombia. pp 283-313.
- San Miguel Ayanz, A., 2007. Leguminosas de interés para la implantación de praderas. Ecología y pautas básicas de utilización. Departamento de Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S. Ingenieros de Montes.
- Sulas, L., Re, G.A., Caredda, S., Etienne, M., 1999. Hard seed breakdown pattern of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in relation to its regeneration capacity and persistence. En proceedings of the FAO-CHIEM Inter-regional Co-op Research and Development Network`. Cahiers Options Méditerranéenes 39: 78-82.

Taylor, G.B., Ewing, M.A., 1988. Effect of depth of burial on the longevity of hard seeds of subterranean clover and annual medics. Austr J Exp Agric., 28: 77-81.

## **CONCLUSIONES**

---



According to the agronomic and genetic diversity studies, and breeding in *Hedysarum coronarium* L. carried out in order to (i) optimize their harvesting regimes, (ii) select plant materials, (iii) develop new lines and, (iv) set the molecular basis for gene expression studies, the following conclusions can be reached:

1. The present study documented large phenotypic variability among Andalusian wild populations of *H. coronarium*. From a breeding point of view, the observed diversity could be a great advantage when searching for *H. coronarium* material to exploit different potential uses in semi-arid Mediterranean environments.
2. According to the position of the accessions in the plane of principal components 1 and 2, three groups were established. The first group including commercial varieties and natural ecotypes was characterized by a high yield due to highest vegetative features. The second group presented intermediate characteristics and may be used for forage or pasture. Finally, the third one would be selected for grazing due to smaller plant size of the entries
3. The potential of *H. coronarium* as a fodder plant with production exceeding 3.800 kg dry matter/ha in Andalusia, indicates that it might be a species to be included in the alternative culture of our dryland.
4. Crop management cannot be generalized because the results showed that the ideal harvest date depends on the genotype and the environment in which crop is developed.
5. There is evidence that *H. coronarium* induces the germination of the parasitic plant *Orobanche crenata* and allows the development of their nodules. Therefore, sulla can be considered a host of this parasitic plant.
6. Content of condensed tannins in *H. coronarium* showed significant differences among genotypes and individuals within the same genotype. This reflects a significant degree of variability in the material studied that would allow *a priori* identification of genotypes of interest for future breeding programs in the species.

7. A set of different reference genes is provided for their use as reference standards to normalize gene expression data from different stresses in *H. coronarium*. These internal standards can be used in expression studies of different traits and different experimental conditions in the species.
8. The population of *H. coronarium* developed so far is very promising. The breeding program will continue over the next years to obtain populations well-adapted to Jerez conditions that could give maximum production of forage quality.



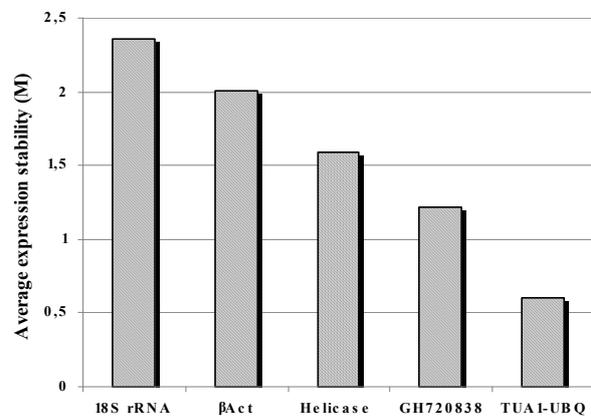
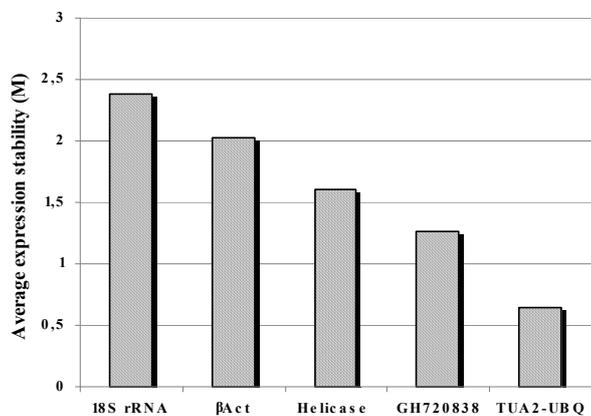


**ANEXO I: Valores de Cq de los diferentes genes de referencia en diferentes tejidos y media y desviación estándar (SD) de todos los tejidos**

<b>Muestra</b>	<b><i>βAct</i></b>	<b><i>TUAI</i></b>	<b><i>TUA2</i></b>	<b><i>UBQ</i></b>	<b><i>Helicasa</i></b>	<b><i>18S</i></b>	<b><i>GH720838</i></b>
1	23,1	23,51	23,65	25,7	30,73	19,32	26,86
2	27,82	22,76	22,71	24,68	28,55	21,11	30,14
3	31,08	23,02	22,87	25,6	27,28	20,5	29,84
4	29,72	22,61	22,46	23,57	26,36	20,32	27,83
5	25,84	23,02	24,91	24,95	25,34	15,05	26,16
6	24,65	23,20	22,78	24,80	24,84	15,93	29,15
7	31,03	23,09	22,83	25,29	24,41	26,47	28,47
8	23,97	23,08	22,62	24,98	22,83	22,90	26,49
9	26,31	22,53	22,52	25,74	25,66	17,02	26,97
10	28,41	23,7	22,88	24,47	23,31	22,37	26,26
11	28,47	22,94	22,50	24,90	24,26	21,73	27,07
12	30,78	23,33	22,89	24,72	24,13	21,34	27,63
13	22,52	23,31	22,42	24,35	28,73	21,07	26,68
14	27,80	22,94	22,76	24,37	30,26	16,71	29,41
15	30,09	22,62	22,42	23,81	27,00	24,96	31,16
16	29,23	22,54	22,36	23,86	26,01	23,89	27,42
17	25,59	23,57	23,47	25,18	25,51	20,28	25,68
18	25,04	23,14	22,82	24,82	24,6	16,44	28,78
19	31,35	23,30	23,02	25,37	24,38	23,82	28,17
20	24,26	22,85	22,80	25,52	24,86	20,86	26,20
21	26,17	22,58	22,35	25,45	25,70	17,39	26,23
22	28,24	23,36	22,76	23,96	24,28	21,92	26,63
23	28,22	23,16	22,64	24,86	24,42	21,60	27,55
24	29,97	22,59	22,51	23,95	23,65	23,65	26,72
Valores médios Cq	27,49	23,03	22,83	24,79	25,71	20,69	27,65
SD	2,68	0,34	0,54	0,63	2,09	3,00	1,45

**Condiciones de estreses usadas en el análisis de expresión génica: (1) hojas sin tratamiento hormonal; (2) hojas con tratamiento hormonal; (3) raíces sin tratamiento hormonal; (4) raíces con tratamiento hormonal; (5) hojas sin tratamiento osmótico; (6) hojas con tratamiento osmótico; (7) raíces sin tratamiento osmótica; (8) raíces con tratamiento osmótica; (9,12) controles de hojas y raíces; (10, 11) controles de cotiledones y radículas; (13-24) repeticiones biológicas de las muestras.**

**ANEXO II: Valores médios de la estabilidad de la expresión ,M, de los genes de referencia cuando eliminamos alternativamente la TUA1 ó TUA2 (susceptibles a la correulación) del análisis.**



**ANEXO III : Semillas producidas (g) por cada una de las plantas recogidas en junio del 2008**

<b>Población</b>	<b>Individuo</b>	<b>Producción de semillas (g)</b>	<b>Población</b>	<b>Individuo</b>	<b>Producción de semillas (g)</b>
26	1	7,4	26	43	41,8
26	2	68,8	26	44	4,2
26	3	12	26	45	33,4
26	4	23,3	26	46	34,1
26	5	15,4	26	47	15,8
26	6	3,7	26	48	6,8
26	7	3,7	26	49	29,5
26	8	1,7	26	50	29
26	9	52	26	51	44,5
26	10	6,6	26	52	23,3
26	11	26,6	26	53	20,6
26	12	18	26	54	30
26	13	54,6	26	55	80,3
26	14	16,4	26	56	28,8
26	15	33,5	26	57	36,6
26	16	40,2	26	58	27
26	17	18,8	26	59	30,1
26	18	31,4	26	60	2,1
26	19	31,8	26	61	30,2
26	20	40,7	26	62	48,3
26	21	23,4	26	63	32,4
26	22	60,5	26	64	41,3
26	23	25,9	26	65	44,8
26	24	2	26	66	32,8
26	25	57,6	26	67	14
26	26	16,2	26	68	47,5
26	27	1,5	26	69	82,8
26	28	48,5	26	70	5,8
26	29	18,8	26	71	17,7
26	30	38,9	26	72	26,6
26	31	30,9	26	73	5,4
26	32	25,1	26	74	53,8
26	33	51	26	75	42,6
26	34	10,9	26	76	42,9
26	35	38,5	26	77	29,7
26	36	38,8	26	78	44,5
26	37	4,8	26	79	31,9
26	38	41,7	26	80	4,1
26	39	45,7	26	81	21,4
26	40	12,9	26	82	31,5
26	41	21	26	83	3,5
26	42	14,6	26	84	32,6

<b>Población</b>	<b>Individuo</b>	<b>Producción de semilla (g)</b>	<b>Población</b>	<b>Individuo</b>	<b>Producción de semilla (g)</b>
3	1	3,8	3	46	3,4
3	2	1,3	3	47	3,4
3	3	9,4	3	48	6,5
3	4	25,7	3	49	35,1
3	5	13,5	3	50	14,5
3	6	3,9	3	51	14,9
3	7	16,3	3	52	7,8
3	8	10,1	3	53	10,5
3	9	10,9	3	54	7,5
3	10	13,2	3	55	2,9
3	11	30,5	3	56	7,6
3	12	16,8	3	57	3,4
3	13	8,5	3	58	6,6
3	14	10,3	3	59	11,1
3	15	24,7	3	60	15,4
3	16	15,8	3	61	6
3	17	12,5	3	62	28
3	18	6	3	63	5,2
3	19	12,7	3	64	16,5
3	20	3,3	3	65	20
3	21	3,1	3	66	9,8
3	22	11,1	3	67	13,6
3	23	2,4	3	68	36,4
3	24	16,2	3	69	16,3
3	25	4,2	3	70	4,5
3	26	5	3	71	0,5
3	27	39,4	3	72	4,4
3	28	12,3	3	73	7,6
3	29	9,2	3	74	12,8
3	30	4,3	3	75	22,1
3	31	3	3	76	7
3	32	4	3	77	7,7
3	33	7	3	78	4,4
3	34	2,5	3	79	3,4
3	35	4,2	3	80	0,8
3	36	15,3	3	81	4,2
3	37	4	3	82	7,7
3	38	11,3	3	83	14,2
3	39	14,6	3	84	10,9
3	40	13,5	3	85	0,9
3	41	4,7	3	86	9
3	42	1,3	3	87	2,3
3	43	5,4	3	88	1
3	44	13,7	3	89	9,9
3	45	6,2			

**ANEXO IV: Tablas de temperaturas medias y precipitaciones**

**IFAPA Centro “Alameda del Obispo” (Córdoba) campaña 2007/08**

<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>T<sup>a</sup> media (°C)</b>	<b>Precipitaciones (mm)</b>
2007	Septiembre	23,65	24,2
	Octubre	17,95	32,4
	Noviembre	11,04	105,2
	Diciembre	8,32	27,4
2008	Enero	9,44	69
	Febrero	11,83	72,1
	Marzo	12,61	9,4
	Abril	15,37	194,8
	Mayo	17,51	55,8
	Junio	24,7	7,4
	Julio	27,1	22,2
<b>Media de las T<sup>a</sup></b>		16,32	
<b>Precipitaciones totales</b>		619,90	

**IFAPA Centro “Alameda del Obispo” (Córdoba) campaña 2008/09**

<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>T<sup>a</sup> media (°C)</b>	<b>Precipitaciones (mm)</b>
2008	Septiembre	22,03	73
	Octubre	17,86	54
	Noviembre	9,89	41
	Diciembre	7,42	49
2009	Enero	7,89	69,6
	Febrero	9,89	82,3
	Marzo	13,44	97,2
	Abril	14,52	30,2
	Mayo	20,08	5,2
	Junio	24,85	7
	Julio	27,63	1
<b>Media de la T<sup>a</sup></b>		15,95	
<b>Precipitaciones totales</b>		509,5	

**IFAPA Centro “Las Torres-Tomejil” (Carmona) campaña 2008/09**

<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>T<sup>a</sup> media (°C)</b>	<b>Precipitaciones (mm)</b>
<b>2008</b>	Septiembre	22,16	46,6
	Octubre	18,4	53,6
	Noviembre	11,02	8,6
	Diciembre	8,75	38
<b>2009</b>	Enero	9,03	43,2
	Febrero	10,83	81,2
	Marzo	14,79	38,4
	Abril	15,34	22,8
	Mayo	20,66	7,6
	Junio	24,92	14,2
	Julio	27,39	0
<b>Media de la T<sup>a</sup></b>			16,66
<b>Precipitaciones totales</b>			354,2

**IFAPA Centro “Rancho de la Merced” (Jerez de la Frontera) campaña 2008/09**

<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>T<sup>a</sup> media (°C)</b>	<b>Precipitaciones (mm)</b>
<b>2008</b>	Septiembre	21,89	84,4
	Octubre	18,15	170
	Noviembre	11,88	58,8
	Diciembre	10,15	70,2
<b>2009</b>	Enero	9,71	77,8
	Febrero	11,58	93,4
	Marzo	14,71	47,8
	Abril	14,63	79,8
	Mayo	19,34	9,6
	Junio	23,14	0,6
	Julio	25,06	0,4
<b>Media de la T<sup>a</sup></b>			16,39
<b>Precipitaciones totales</b>			692,8

**IFAPA Centro “Rancho de la Merced” (Jerez de la Frontera) campaña 2010/11**

<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>T<sup>a</sup> media (°C)</b>	<b>Precipitaciones (mm)</b>
<b>2010</b>	Septiembre	23,78	14,6
	Octubre	18,15	73
	Noviembre	13,43	97,8
	Diciembre	13,4	142,4
	Enero	11,61	60,2
<b>2011</b>	Febrero	11,6	75
	Marzo	13,76	111,8
	Abril	18,43	0,5
	Mayo	20,2	6,4
	Junio	22,45	0,4
	<b>Media de la T<sup>a</sup></b>		
<b>Precipitaciones totales</b>			434,1





**TÍTULO DE LA TESIS: Estudios agronómicos y de mejora genética en *Hedysarum coronarium* L.: alternativa en agrosistemas de secano mediterráneos.**

**DOCTORANDO/A: Eva María Córdoba Jiménez**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral de Dña. Eva María Córdoba Jiménez se ha llevado a cabo en el IFAPA Centro Alameda del Obispo de Córdoba, en las Áreas de Producción Agraria y de Mejora y Biotecnología de Cultivos. Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, la doctoranda no solo ha superado ampliamente los objetivos planteados al comienzo de la misma, sino que ha desarrollado y validado técnicas experimentales de una gran utilidad para el grupo de investigación, que le han permitido obtener resultados muy relevantes, que en un futuro cercano quedarán patentes en varias publicaciones con factor de impacto. Concretamente como fruto del trabajo de la doctoranda ya han sido publicados dos trabajos, uno en la revista *Plant Disease*, y otro en *Analytical Biochemistry*.

Córdoba, E., González-Verdejo, C. I., Die, J., Román, B., and Nadal, S., 2008. First report of *Orobanche crenata* on sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in Andalusia, Southern Spain. *Plant Disease*, 92 (12): 1709. FI: 1.874 Q2 (Plant Sciences)

Cordoba, E.M., Die, J.V., González-Verdejo, C.I., Nadal, S., Roman, B, 2011. Selection of reference genes in *Hedysarum coronarium* under various stresses and stages of development. *Analytical Biochemistry*, 409: 236-243. FI: en 2009 el factor de impacto fue de 3.328 Q1 (Chemistry, Analytical)

Además el trabajo realizado permitirá, en la medida de lo posible, la publicación de 3 artículos científicos más, que actualmente se encuentran en distinto estado de desarrollo.

Por último, la doctoranda ha presentado sus resultados en diferentes congresos nacionales (3) e internacionales (1), jornadas técnicas (1) y visitas de campo (1).

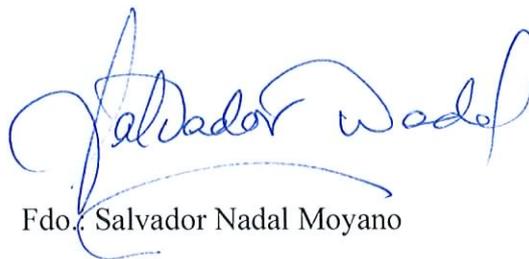
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 3 de septiembre de 2011

Firma de los directores



Fdo.: José Ignacio Cubero Salmerón



Fdo.: Salvador Nadal Moyano