

## PRODUCCIÓN Y VALOR NUTRITIVO DE ESPARCETA INOCULADA CON DOS CEPAS DE *Rhizobium* sp. EN ASTURIAS

J.A. OLIVEIRA-PRENDES<sup>1</sup>, P. PALENCIA<sup>1</sup>, E. AFIF-KHOURI<sup>1</sup>, I. DELGADO<sup>2</sup> Y F. TEMPRANO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Áreas de Producción Vegetal y de Ingeniería Agroforestal. Universidad de Oviedo. C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós s/n. 33600 Mieres (España). oliveira@uniovi.es; palencia@uniovi.es; elias@uniovi.es.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana 930. 5059 Zaragoza (España). idelgado001@hotmail.com.

<sup>3</sup>IFAPA-Centro Las Torres. Ctra Sevilla-Alcalá del Río, km 12,2. 41200 Alcalá del Río, Sevilla (España). francisco.temprano@juntadeandalucia.es.

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la inoculación con dos cepas *Rhizobium* (ISO3 e ISO12) de la semilla de esparceta del tipo “dos cortes” de Reznos (Soria) sobre la producción de forraje y su valor nutritivo en Asturias, durante 2014 y 2015. El estudio se efectuó en siembra primaveral en 2014. Se compararon cinco tratamientos: inoculación con la cepa ISO3; inoculación con la cepa ISO12; testigo sin inocular; sin inocular y con aporte de 50 kg N/ha y *Trifolium pratense* cv Altas Wede. Las mayores producciones anuales de materia seca se encontraron en los tratamientos con esparceta (8989 a 13 484 kg MS/ha) frente al del trébol violeta (7444-8945 kg MS/ha), no habiendo un efecto claro de la inoculación. Los tratamientos de esparceta presentaron menor contenido en proteína bruta (14,6-19,2%) que el trébol violeta (22,5%), siendo los valores de la proteína en los tratamientos inoculados (16,8-19,2%) más altos que en los no inoculados (14,6-16,4%), no habiendo diferencias entre las dos cepas usadas. Los muestreos realizados en diciembre de 2014 y 2015, mostraron que todas las plantas de esparceta presentaban nódulos, aunque hubo diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y no inoculados, a favor de los inoculados.

**Palabras clave:** fibra ácido detergente, fibra neutro detergente, *Onobrychis viciifolia* Scop., proteína bruta, *Trifolium pratense* L.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de leguminosas y gramíneas forrajeras constituye uno de los puntos fundamentales en el desarrollo de sistemas sostenibles de producción de rumiantes en Europa (Lüsher *et al.*, 2014). La esparceta o pipirigallo (*Onobrychis viciifolia* Scop.) es una leguminosa forrajera plurianual, tradicional de las regiones semiáridas, moderadamente cálidas y de altitud superior a 600 metros de la península Ibérica (Delgado *et al.*, 2002). Es muy apreciada por los agricultores por su adaptación a suelos poco profundos y capacidad para fijar el nitrógeno del aire gracias a las bacterias *Rhizobium*, que le permite prescindir o reducir el aporte de abonos nitrogenados. Se utiliza, por ello, como cultivo alternativo en rotación con los cereales para mejorar la fertilidad del suelo y romper el ciclo de los parásitos y de las malas hierbas (Montserrat y Capdevilla, 1964). Es también apreciada por los ganaderos por su alto contenido en proteína bruta, palatabilidad y capacidad de ingestión voluntaria (Beever *et al.*, 1986), y porque permanece verde durante el invierno y concentra la producción de forraje en primavera facilitando su henificado o ensilado (Delgado *et al.*, 2008). Contiene componentes “bioactivos” que optimizan el uso de las proteínas en alimentación animal, reduciendo las emisiones de gas metano, controlando los parásitos intestinales y mejorando la calidad de la leche y los productos cárnicos obtenidos (Lüsher *et al.*, 2014). En 2013, la superficie del cultivo de esparceta en España fue de 19 860 ha, destacando Aragón con 11 265 ha (MAGRAMA, 2015).

Entre las leguminosas pratenses, el trébol violeta (*Trifolium pratense* L.) ofrece ventajas específicas en comparación con otras especies de climas templados, ya que puede ser un cultivo forrajero útil para extender la estación de pastoreo en el Norte de España durante el verano (Flores *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo es la evaluación por primera vez en Asturias del comportamiento agronómico de la esparceta inoculada con dos cepas de *Rhizobium* mediante la determinación de la producción y valor nutritivo de su forraje.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

El ensayo se realizó en una parcela perteneciente a la finca "Casero", localizada en Candás, Asturias, España, (43° 35' N, 5° 47' O y 80 m s.n.m.), en la que nunca se había cultivado esparceta. Los valores de las temperaturas medias (14,6 y 14,3 °C en 2014 y 2015, respectivamente) y precipitaciones anuales (875 y 884 mm en 2014 y 2015, respectivamente) fueron similares a las del año medio (14 °C y 1017 mm, respectivamente). Previamente a la siembra, se realizó un análisis de suelo de la parcela. El suelo resultó ser franco arenoso arcilloso, ligeramente ácido (pH = 6,3), no salino, con concentraciones de materia orgánica altas (4,3%), relación carbono nitrógeno adecuada (12), capacidad de intercambio catiónico efectiva adecuada (14,1 cmol<sub>(+)</sub>/kg), contenidos en P Mehlich 3 (41 ppm) y K (0,90 cmol<sub>(+)</sub>/kg) altos.

El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Las parcelas fueron de 2 x 5 m y se sembraron el 11/04/2014, con semilla sin decorticar de esparceta cv Reznos a una dosis de 100 kg/ha y *Trifolium pratense* cv Altas Wede a la dosis de 10 kg/ha de semilla. Se compararon cinco tratamientos: 1: inoculación con la cepa ISO3; 2: inoculación con la cepa ISO12; 3: testigo sin inocular; 4: sin inocular y con aporte de 50 kg N/ha y 5: *T. pratense*. La inoculación de las semillas se realizó antes de la siembra empleando una cantidad de inoculante equivalente al 1% del peso de aquellas y una solución adhesiva de goma arábiga al 25%. En el establecimiento (23/04/2014) se realizó un muestreo por parcela, con un marco metálico de 1 x 1 m con el fin de determinar la densidad de plantas y se obtuvieron valores comprendidos entre 70 y 100 plantas por m<sup>2</sup>. El 16/05/2014 se aplicó el herbicida Pulsar 40® (Imazamox 4%), en postemergencia contra malas hierbas anuales (gramíneas y dicotiledóneas) con una dosis de 1 L/ha. El mismo día se aplicaron 50 kg N/ha con el abono nitrato amónico cálcico del 27% N en el tratamiento 4. El 22/03/2015, se volvieron a aportar 50 kg N/ha en el tratamiento 4.

Se realizaron tres cortes en 2014 (19/06/2014, 29/07/2014 y 12/08/2014) y cuatro cortes en 2015 (30/04/2015, 05/06/2015, 10/07/2015 y 02/09/2015) con motosegadora de 100 cm de anchura de barra de corte, sobre una superficie de 4 m<sup>2</sup> (1 x 4 m) por parcela, anotándose también las alturas alcanzadas por las plantas en cuatro puntos de cada parcela. El momento del corte fue el de inicio de floración a floración en la esparceta. Se tomó una muestra al azar de aproximadamente 100 g de biomasa por cada repetición y tratamiento y se secó en estufa de circulación de aire forzado a 70 °C hasta peso constante. Las muestras secas se molieron en un molino de laboratorio y se cribaron en un tamiz de 1 mm de luz de malla para realizar determinaciones de valor nutritivo (proteína bruta (PB), fibras neutro detergente (FND) y ácido detergente (FAD)) en el Laboratorio de Nutrición Animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Villaviciosa, Asturias.

#### **Análisis del grado de nodulación**

Se realizaron dos muestreos por parcela elemental de las plantas presentes en un marco metálico de 0,20 x 0,20 m, en diciembre de 2014 y de 2015. Se procedió al lavado cuidadoso de las

plantas muestreadas en cada uno de los marcos y a un conteo manual de los nódulos presentes en las raíces de cada una de ellas. El peso seco de los nódulos se determinó después del secado de los mismos en estufa de circulación de aire forzado a 70 °C, hasta peso constante.

#### **Análisis estadísticos**

La producción de materia seca, humedad del forraje, altura de las plantas, PB, FND y FAD se analizaron mediante un análisis de varianza de manera independiente por cada año, debido a que el número de cortes fue diferente en cada año. En el análisis de varianza se incluyó la fecha de corte como una medida repetida en el tiempo. La significación del factor tratamiento se evaluó sobre la interacción tratamiento x repetición y el factor fecha de corte y la interacción fecha de corte x tratamiento sobre el cuadrado medio del error. El número de nódulos y el peso seco de los mismos por planta se analizaron también de manera independiente por cada año, incluyendo los factores repetición y tratamiento. Se efectuó la separación de medias entre los niveles del factor tratamiento mediante el test Tukey a un nivel de significación del 5%. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 22 (SPSS, 2013).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Producción de materia seca por hectárea y altura de las plantas**

Se obtuvieron diferencias significativas en todas las variables estudiadas en cada uno de los dos años de estudio. La humedad media del forraje en el momento del corte fue un poco mayor en el trébol violeta (80,8-81,5%) respecto a los tratamientos de esparceta (69,6-80,3%) (Tabla 1). Las mayores producciones anuales de materia seca se encontraron en los tratamientos con esparceta (8989 a 13 484 kg MS/ha) frente al del trébol violeta (7444-8945 kg MS/ha) (Tabla 1), no habiendo un efecto claro de la inoculación.

**Tabla 1. Valores medios de humedad del forraje, producción anual de materia seca y altura de las plantas de los cinco tratamientos estudiados: 1 =Inoculación con *Rhizobium* ISO3, 2 = Inoculación con *Rhizobium* ISO12, 3 = Sin inocular, 4 = Sin inocular y 50 kg N/ha y 5 = T. *pratense***

Año	Tratamiento	Humedad (%)	Producción (kg MS/ha)	Altura (cm)
2014	1	79,7ab	10.941a	58a
	2	80,1ab	10.613ab	59a
	3	79,2b	10.459ab	60a
	4	79,3ab	11.434a	60a
	5	81,5a	7.444b	28b
	SEM	0,47	712	0,6
2015	1	80,3ab	13.484a	54a
	2	79,9ab	12.497ab	56a
	3	69,6b	8.989b	44b
	4	78,7ab	10.877ab	53a
	5	80,8a	8.945b	27c
	SEM	2,44	826	0,7

Medias seguidas por letras diferentes en columnas fueron estadísticamente significativas de acuerdo al test Tukey con un nivel de significación del 5%, siendo a>b>c. SEM es el error estándar de la media.

La producción de materia seca se igualó más a la obtenida por Delgado *et al.* (2011) en regadío en Zaragoza, 11 442 kg MS/ha, que a la de su cultivo tradicional en secano, lo que se justificaría por la alta pluviosidad de la localización del ensayo. Aunque no se evaluó su persistencia,

se apreció un agotamiento del cultivo en el segundo año de aprovechamiento, coincidiendo con los resultados aportados por Delgado *et al.* (2011) en regadío y que se atribuyeron al agotamiento del cultivo explotado intensivamente.

La altura de las plantas en el momento del corte fue mayor en los tratamientos de esparceta (44-60 cm) respecto al trébol violeta (27,3-27,7 cm) (Tabla 1).

#### Valor nutritivo del forraje

Los tratamientos de esparceta presentaron menor contenido en PB (14,6-19,2%) que el cultivar de trébol violeta (22,5%), siendo los valores de la proteína en los tratamientos inoculados (16,8-19,2%) más altos que en los no inoculados (14,6-16,4%), no habiendo diferencias entre las dos cepas de *Rhizobium* usadas (Tabla 2). Los mayores contenidos en PB en los tratamientos de esparceta inoculada respecto a los tratamientos sin inocular se pueden explicar por la mayor disponibilidad de nitrógeno, fruto de la fijación simbiótica en los tratamientos inoculados en comparación con los tratamientos sin inocular. Los tratamientos de esparceta presentaron valores más altos de FND (38,0-40,0%) como de FAD (22,9-25,0%) que el trébol violeta (37,0-37,8% de FND y 22,1-22,3% de FAD). Estos valores más altos podrían ser debidos al estado de madurez fisiológica más avanzado (inicio de floración a floración) de la esparceta en el momento del corte en comparación al trébol violeta (estado vegetativo a botón floral), según indicaban en veza Treviño *et al.* (1979). Los valores de proteína bruta y fibras son consistentes con otros resultados obtenidos en ensayos de esparceta (Bal *et al.*, 2006; Kaplan, 2011), teniendo en cuenta que el lugar donde se cultiva la esparceta tiene un efecto significativo en el valor nutritivo de la esparceta en floración (Kaplan, 2011).

**Tabla 2. Valores medios de proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) de los cinco tratamientos estudiados: 1 =Inoculación con *Rhizobium* ISO3, 2 = Inoculación con *Rhizobium* ISO12, 3 = Sin inocular, 4 = Sin inocular y 50 kg N/ha y 5 = *T. pratense***

Año	Tratamiento	PB(% , bs)	FND (% ,bs)	FAD (% ,bs)
2014	1	16,8c	38,5a	23,1ab
	2	17,7b	38,4a	23,4a
	3	14,7e	38,1b	22,9b
	4	16,4d	38,0b	23,1ab
	5	22,5a	37,8c	22,3c
	SEM	0,06	0,06	0,07
2015	1	19,2b	39,6ab	24,3bc
	2	17,0c	39,9a	24,7ab
	3	14,6e	39,4b	23,9c
	4	15,7d	40,0a	25,0a
	5	22,5a	37,0c	22,1d
	SEM	0,22	0,10	0,11

bs = base seca. Medias seguidas por letras diferentes en columnas fueron estadísticamente significativas de acuerdo al test Tukey con un nivel de significación del 5%, siendo a>b>c>d>e. SEM es el error estándar de la media.

#### Nodulación

En los muestreos realizados en diciembre de 2015, se observó un pequeño número de plantas presentes en cada marco de muestreo (1-2 plantas), lo que indica la poca presencia de plantas de esparceta al final del segundo año de cultivo. Se observó un gran número de nódulos en los tratamientos 1 y 2, lo que corrobora la eficacia de la inoculación (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas en la capacidad de nodulación entre las dos cepas estudiadas. Se observó

cierta aparición de nodulaciones en los tratamientos 3 y 4 debido probablemente a escorrentía por la lluvia, desplazamiento por las parcelas, etc. Previamente se había determinado que en el terreno no había rizobios capaces de nodular la esparceta o que la densidad de sus poblaciones era muy baja (inferior en promedio a 0,14 rizobios/g de suelo).

**Tabla 3. Valores medios del número de nódulos por planta y peso seco de los mismos de los cuatro tratamientos con esparceta: 1 =Inoculación con *Rhizobium*ISO3, 2 = Inoculación con *Rhizobium* ISO12, 3 = Sin inocular y 4 = Sin inocular y 50 kg N/ha**

Año	Tratamiento	Nº de nódulos/planta)	Peso seco de los nódulos/planta (g)
2014	1	58a	0,064a
	2	36ab	0,049ab
	3	5b	0,009b
	4	5b	0,013b
	SEM	7,4	0,010
2015	1	32a	0,030a
	2	26a	0,023ab
	3	5b	0,004bc
	4	5b	0,003c
	SEM	2,7	0,004

Medias seguidas por letras diferentes en columnas fueron estadísticamente significativas de acuerdo al test Tukey con un nivel de significación del 5%, siendo a>b>c.SEM es el error estándar de la media.

### CONCLUSIONES

Se obtuvieron mayores producciones anuales de materia seca para todos los tratamientos con esparceta frente al del trébol violeta.

Los valores medios anuales de proteína bruta fueron más altos en el tratamiento del trébol violeta frente a los de los tratamientos de esparceta. Dentro de los tratamientos de esparceta los tratamientos inoculados presentaron valores mayores de proteína bruta que los tratamientos no inoculados.

La nodulación de la esparceta resultó eficaz, no tanto en su influencia en la producción de materia seca sino por sus valores más altos de proteína bruta.

La esparceta puede ser un cultivo forrajero de corta duración interesante en Asturias por su alta producción de materia seca de buen valor nutritivo en primavera-verano.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Adela Martínez Fernández, responsable del Programa de Pastos y Forrajes del SERIDA de Villaviciosa (Asturias), por la realización de los análisis de valor nutritivo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAL M.A., OZTURK D., AYDIN R., EROL A., OZKAN C.O., ATA M., KARAKAS E. Y KARABAY P. (2006) Nutritive value of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) harvested at different maturity stages. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9**, 205-209.
- BEEVER D., DHANOA M., LOSADA H., EVANS R., CAMMELL S. Y FRANCE J. (1986) The effect of forage species and stage of harvest on the processes of digestion occurring in the rumen of cattle. *British Journal of Nutrition*, **56**, 439-454.

- DELGADO I., ANDRES C., SIN E. Y OCHOA M. (2002) Estado actual del cultivo de la esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Encuesta realizada a agricultores productores de semilla. *Pastos*, **XXXII (2)**, 235-247.
- DELGADO I., MUÑOZ F., DEMDOUM S., BUIL I. Y CONGOST S. (2008) *La esparceta o pipirigallo*. Zaragoza, España: (Ed) Diputación General de Aragón.
- DELGADO I., MUÑOZ F. Y DEMDOUM S. (2011) Efecto del pastoreo sobre la producción y persistencia de un cultivo de esparceta. *Pastos*, **41 (2)**, 177-189.
- FLORES G., RESCH C., FERNANDEZ-LORENZO B., GONZALEZ-ARRAEZ A., VALLADARES J., DAGNAC T., LATORRE A., AGRUÑA M.J., PEREIRA S., DIAZ N., GIMENEZ R. Y RODRIGUEZ-DIZ X. (2011) Efecto del pastoreo de verano de trébol violeta sobre el contenido en omega-3 de la leche de vacuno. *Pastos*, **41(1)**, 79-99.
- KAPLAN M. (2011) Determination of potential nutritive value of sainfoin (*Onobrychis sativa*) hays harvested at flowering stage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10(15)**, 2028-2031.
- LÜSHER A., MUELLER-HARVEY I., SOUSSANA J.F., REES R.M. Y PEYRAUD J.L. (2014) Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science*, **69**, 206-228.
- MAGRAMA (2015) *Anuario de Estadística Agraria 2014*. Madrid, España.
- MONTSERRAT P. Y CAPDEVILLA M. (1964) La esparceta en el nordeste español. En: SEEP (Ed) *V Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos*, pp.131-138. Jaca, (Huesca) y Pamplona, España.
- SPSS (2013) *SPSS for Windows, version 22*. Chicago, USA: SPSS Inc.
- TREVIÑO J., CABALLERO R. Y GIL J. (1979) Efecto del estado de madurez de la planta sobre la productividad de la veza. Rendimiento en proteína y energía. *Pastos*, **9(2)**, 150-156.

## **YIELD AND NUTRITIVE VALUE OF SAINFOIN INOCULATED WITH TWO STRAINS OF *Rhizobium* sp. IN ASTURIAS**

### **SUMMARY**

The effect of inoculation with two strains of *Rhizobium* (ISO3 and ISO12) on seed of a sainfoin type 'two cuts' from Reznos (Soria) on forage yield and nutritive value was studied in Asturias during 2014-2015. Field experiments were conducted in spring sowing in 2014 in Candás (Asturias). Five treatments were set up: 1: inoculation with ISO3 strain; 2: inoculation with ISO12 strain; 3: un-inoculated control; 4: un-inoculated plus N-fertilization (50 kg N/ha) and 5: *Trifolium pratense* cv AltasWedde. The largest annual production of dry matter were found in treatments with sainfoin (8989-13 484 kg DM/ha) compared to red clover (7444-8945 kg DM/ha), not having a clear effect of inoculation. Sainfoin treatments had lower crude protein content (14.6 to 19.2%) than red clover (22.5%) being the values of the protein in the inoculated treatments (16.8 to 19.2%) higher than the in the un-inoculated (14.6 to 16.4%), with no differences between the two strains used. An observation of two samples taken per plot at the end of 2014 and 2015 showed that all sainfoin treatment plants had *Rhizobium* nodules, but there were significant differences between treatments inoculated (greater number of nodules) and un-inoculated.

**Key words:** acid detergent fiber, neutral detergent fiber, *Onobrychis viciifolia* Scop., crude protein, *Trifolium pratense* L.