

La producción y el valor nutritivo del primer corte de la alfalfa crecida en invernaderos de gradiente térmico en condiciones de cambio climático varían con la cepa de *Sinorhizobium meliloti*

Yield and nutritional value of first-cutting alfalfa grown in temperature gradient greenhouses under future climate change scenarios depend on *Sinorhizobium meliloti* strain

A. SANZ-SÁEZ¹ / G. ERICE¹ / J. AGUIRREOLEA¹ / F. MUÑOZ² / M. SÁNCHEZ-DÍAZ¹ / J.J. IRIGOYEN¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Sección Biología Vegetal (Unidad Asociada al CSIC, EEAD, Zaragoza e ICV, Logroño) Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, c/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain
²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Avda. de Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain. alvaro_ss@hotmai.com

Resumen: El objetivo del estudio fue analizar bajo distintos escenarios de simulación de cambio climático (CO₂ y temperatura elevados), el efecto de tres cepas de *Sinorhizobium meliloti*, en la producción, calidad y digestibilidad *in-vitro* de la alfalfa. Las alfalfas más productivas en su primer corte durante el mes de noviembre fueron las inoculadas con la cepa 102F34, seguidas por la 102F78 y la 1032GMI. El CO₂ y la temperatura elevados aumentaron el contenido en fibras, disminuyendo la digestibilidad *in-vitro* de la materia seca en las plantas inoculadas con las cepas 102F78 y 1032GMI. La proteína bruta, un indicador de la calidad del forraje, descendió en condiciones de CO₂ y temperatura elevados, independientemente de la cepa inoculada. Si bien las plantas inoculadas con la cepa 102F78 produjeron forraje con mayor concentración de proteína bruta, la mayor digestibilidad obtenida con la cepa 102F34, hizo que de las tres cepas analizadas, sea ésta la más adecuada en el escenario de cambio climático estudiado.

Palabras clave: dióxido de carbono, alta temperatura, invernaderos de gradiente térmico, digestibilidad *in-vitro* de la materia seca.

Abstract: Elevated CO₂ may decrease alfalfa forage quality and *in-vitro* digestibility through a drop in crude protein and an enhancement of fibre content. The aim of the present study was to analyze the effect of elevated CO₂, elevated temperature and *Sinorhizobium meliloti* strains on alfalfa yield, forage quality and *in-vitro* dry matter digestibility. Shoot dry matter under elevated CO₂ and temperature was different depending on the *S. meliloti* strain, with 102F34 inoculated plants being the most productive, followed by 102F78, and then 1032GMI. Plants inoculated with the 102F34 strain did not enhance neutral or acid detergent fibre under elevated CO₂ or temperature and hence, *in-vitro* dry matter digestibility was unaffected. Crude protein content, an indicator of forage quality, was negatively related to shoot yield. Plants inoculated with 102F78 showed a similar shoot yield to those inoculated with 102F34, but had higher crude protein content at elevated CO₂ and temperature. Under these climate change conditions, 102F78 inoculated plants produced more quality forage. However, the higher digestibility of plants inoculated with the 102F34 strain under any CO₂ or temperature conditions, makes them more suitable for growing under applied experimental climate change conditions.

Key words: carbon dioxide, high temperature, temperature gradient greenhouses, *in-vitro* dry matter digestibility.

INTRODUCCIÓN

Según el IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) la concentración atmosférica de CO₂ pasará de 392 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ a 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para finales de siglo. Asimismo, el calentamiento global producido por el incremento del CO₂ podría aumentar la temperatura media del planeta en 4 °C (IPCC, 2007).

Las plantas en ambientes con CO₂ elevado durante largos periodos de tiempo disminuyen la fotosíntesis (aclimatación fotosintética) y, como consecuencia, la producción. Sin embargo, se ha descrito que la respuesta al CO₂ elevado depende de diversos factores, como disponibilidad de N, temperatura, intensidad de luz, etc. (Aranjuelo *et al.*, 2005); observándose que la alta temperatura aumenta la producción de alfalfa expuesta a CO₂ elevado. La disponibilidad de N es otro factor crítico, que limita la fotosíntesis y el crecimiento en condiciones de CO₂ elevado. Así, un aporte extra de N puede evitar la aparición de la aclimatación fotosintética (Sanz-Sáez *et al.*, 2010). La disminución del contenido de N de la parte aérea crecida en una atmósfera de CO₂ elevado, se correlaciona con la calidad del forraje, ya que un descenso en el contenido de N, implica una caída en el contenido de proteína bruta (CP) (Campbell *et al.*, 2000). El CO₂ elevado también incrementa el contenido en fibras, disminuyendo su digestibilidad *in-vitro* para el ganado y, por tanto, su calidad.

La alfalfa en simbiosis con bacterias del género *Sinorhizobium*, al poseer una fuente extra de N, suele mostrar mayor estimulación de la fotosíntesis y crecimiento en CO₂ elevado (Aranjuelo *et al.*, 2005). Por lo tanto, la inoculación con cepas de *S. meliloti* altamente eficientes, podría inhibir la aparición de la aclimatación fotosintética y aumentar la producción y calidad de la alfalfa crecida en CO₂ elevado (Bertrand *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo, fue analizar el efecto del CO₂ elevado, la alta temperatura y la cepa de *S. meliloti* en la producción, calidad y digestibilidad *in-vitro* del primer corte de plantas de alfalfa en su primer año de crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo entre el 20 de septiembre (siembra) y el 20 de noviembre de 2009 (cosecha final) en invernaderos de gradiente térmico (IGT) (Aranjuelo *et al.*, 2005). Se sembraron plántulas de *Medicago sativa* cv. Aragón en macetas de 13 L y se inocularon con las diferentes cepas de *S. meliloti*. A plántulas de 30 días de edad se les aplicaron doce tratamientos resultantes de la combinación lineal de: CO₂ (ambiente vs 700 μmol mol⁻¹), temperatura ambiente vs ambiente + 4 °C y cepa de *S. meliloti* (102F78, 102F34 y 1032GMI). La temperatura media del periodo luminoso durante todo el experimento fue de 13,9°C en el tratamiento ambiente (correspondiendo a 750 grados-día) y de 4°C más en el tratamiento de temperatura elevada (870 grados-día). El fotoperiodo osciló entre 12,18 horas el 20 de septiembre a 9,36 horas el 20 de noviembre. Las plantas con una altura media de 50 cm, se cosecharon al inicio de la floración (67 días de edad). Se analizó el primer corte y el experimento se repitió dos años consecutivos, utilizándose 4 macetas por tratamiento/año.

Crecimiento, contenido en fibras, digestibilidad *in-vitro* de la materia seca, contenido en N y carbohidratos no estructurales

Hojas y tallos se cosecharon, se secaron a 60 °C en estufa y se determinó la materia seca de la parte aérea (SDM). Para los análisis de fibra neutro detergente (NDF)

y fibra ácido detergente (ADF) se utilizó espectroscopia de reflectancia de infrarrojo cercano (NIRS, FOSSNIR Systems 6500, Silver Spring, MD, USA). Más detalles sobre la técnica y calibración en Van Soest *et al.*, 1991. La digestibilidad *in-vitro* de la materia seca (IVDMD) se determinó mediante el método de la pepsina-celulasa (Aufrère y Demarquilly, 1989). El N se determinó con un analizador elemental (EA1108, Series 1, Carlo Erba Instrumentazione, Milan, Italy), y expresó como mg g SDM⁻¹. El contenido de proteína bruta (CP) se calculó como el contenido en N x 6,5. Los carbohidratos no estructurales (NSC), se calcularon como la suma del contenido de azúcares solubles totales (AST) (Yemm y Willis, 1954) y almidón (Jarvis y Walker, 1993).

Análisis estadístico

Se realizó mediante un ANOVA de tres factores (factorial 2 x 2 x 3) (SPSS v.15.0) (CO₂ primero, temperatura segundo y cepa tercer factor respectivamente).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CO₂ elevado no aumentó la materia seca de la parte aérea (SDM) en temperatura ambiente. La combinación de CO₂ y temperatura elevados resultó en una mayor SDM (fig. 1). Esto concuerda con estudios previos, en los que se demuestra que el efecto del CO₂ sobre el crecimiento aumenta en alta temperatura (Aranjuelo *et al.*, 2005). La combinación alfalfa-*Sinorhizobium* que más producción presentó, fue la inoculada con la cepa 102F34 (40,5% del total de la SDM producida por todas las plantas), seguida de 102F78 (34,7%) y 1032GMI (24,8%) (fig. 1). Esta diferencia en la SDM producida por las diferentes cepas, pudo deberse a diferencias en el coste de C de la fijación de N₂.

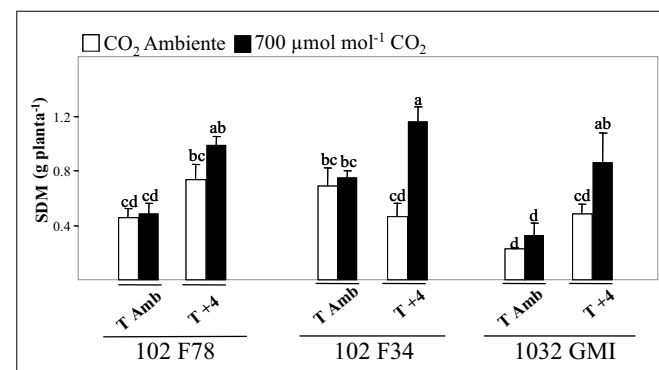


Figura 1. Efecto del CO₂ (ambiente, alrededor de 400 μmol mol⁻¹ o elevado, 700 μmol mol⁻¹), temperatura (ambiente o ambiente +4°C) e inoculación con *S. meliloti* (102F78, 102F34 y 1032GMI) en la materia seca de la parte aérea (SDM, g DM planta⁻¹). Las barras representan la media ± SE; n = 4. Las barras con distinta letra son significativamente diferentes (P ≤ 0,05) de acuerdo con el test LSD.



El CO₂ elevado en temperatura ambiente, aumentó el contenido de NDF y ADF con la cepa 102F78, no mostrándose descenso en la digestibilidad *in-vitro* de la materia seca (IVDMD) (fig. 2). Por el contrario, al someter las plantas al tratamiento de temperatura elevada, el contenido de NDF y ADF aumentó para todas las cepas tanto en CO₂ ambiente como elevado; observándose descenso de la IVDMD con las cepas 102F78 y 1032GMI (fig.2). Estos resultados apoyan los obtenidos por Bertrand *et al.* (2007), que observaron que la variación de ADF y NDF en condiciones de CO₂ elevado, es dependiente de la cepa inoculada. Este aumento en el contenido en fibras con CO₂ y temperatura elevados, se suele asociar a un aumento en el contenido de lignina, principal causante de la baja digestibilidad del forraje (Van Soest, 1994). Con la cepa 102F34 se produjo el forraje más adecuado para el consumo animal desde el punto de vista del contenido de fibras y digestibilidad.

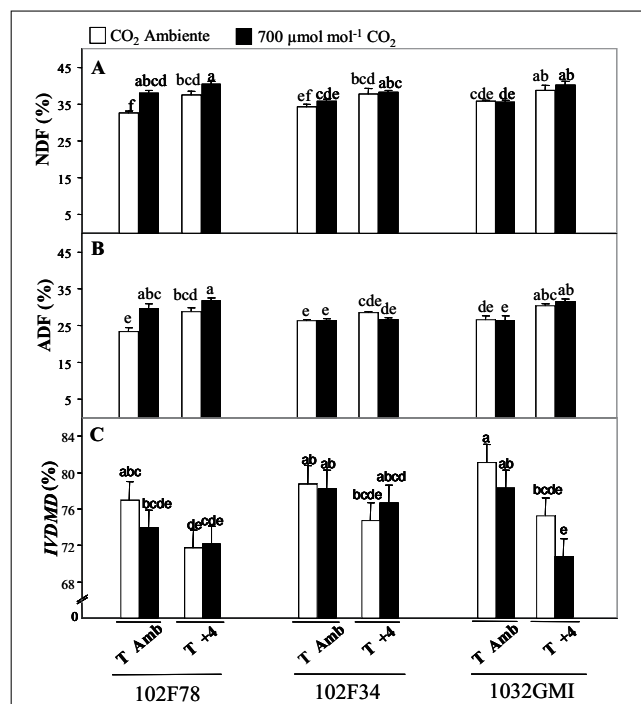


Figura 2. Efecto del CO₂ (ambiente, alrededor de 400 μmol mol⁻¹ o elevado, 700 μmol mol⁻¹), temperatura (ambiente o ambiente +4°C) e inoculación con *S. melliloti* (102F78, 102F34 y 1032GMI) en el contenido fibra neutro detergente (A) (NDF, porcentaje respecto DM), fibra ácido detergente (B) (ADF, porcentaje respecto DM) y digestibilidad *in-vitro* de la materia seca (C) (IVDMD, porcentaje respecto DM). Lo demás como en la figura 1.

Es conocido que el contenido en proteína bruta (CP), es uno de los indicadores de calidad más importantes del forraje. En este estudio, al igual que en el realizado por Milchunas *et al.* (2005), el CO₂ y temperatura elevados descendieron el contenido en CP con todas las cepas, por lo que la calidad del forraje se redujo (fig. 3). La disminución en CP fue debida al efecto directo del CO₂ y no a un efecto de dilución asociado al aumento de carbohidratos no estructurales (NSC). Fisher *et al.* (2002) relacionaron el aumento del contenido de NSC en condiciones de CO₂ elevado, con una aumento de la digestibilidad y calidad del forraje. En el presente estudio, el contenido de NSC permaneció constante en los tratamientos de CO₂ y temperatura elevados (fig. 3), por lo tanto la calidad del forraje no mejoró en este aspecto. El contenido de CP se correlacionó negativamente con la SDM, ya que los tratamientos que más SDM mostraron, fueron los que menor contenido de CP presentaron.

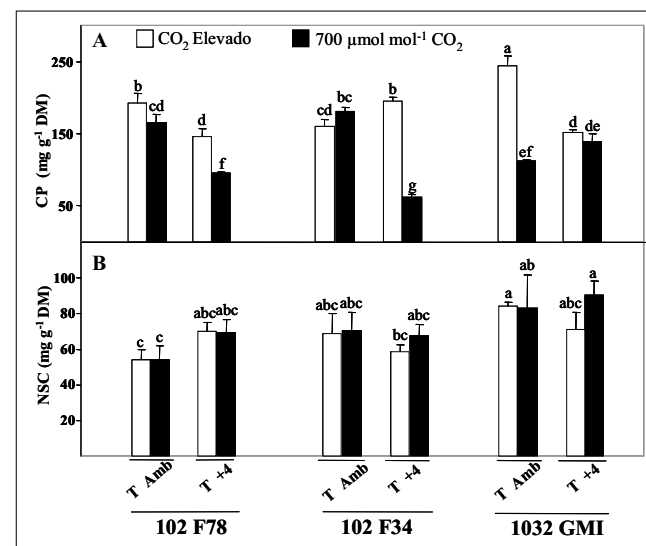


Figura 3. Efecto del CO₂ (ambiente, alrededor de 400 μmol mol⁻¹ o elevado, 700 μmol mol⁻¹), temperatura (ambiente o ambiente +4°C) e inoculación con *S. melliloti* (102F78, 102F34 y 1032GMI) en el contenido de proteína bruta (A) (CP, mg g⁻¹ DM) y carbohidratos no estructurales (B) (NSC, mg g⁻¹ DM). Lo demás como en la figura 1.

CONCLUSIONES

El efecto del CO₂ y la temperatura sobre SDM fue dependiente de la cepa inoculada, siendo las plantas inoculadas con 102F34 las más productivas en su primer corte, seguidas de 102F78 y 1032GMI. La temperatura elevada indujo aumento en NDF y ADF en las plantas inoculadas con 102F78 y 1032GMI, que repercutió en una bajada



de IVDMD; mientras que en las inoculadas con 102F34 este valor no se vio afectado. El contenido en CP disminuyó con el CO₂ y la temperatura elevados, siendo las plantas inoculadas con 102F34 las que menor CP presentaron. En las condiciones estudiadas, las plantas inoculadas con 102F78 presentaron mayor calidad (CP) respecto a la cantidad de forraje producido. Sin embargo, las inoculadas con 102F34 al ser más digeribles bajo cualquier condición de CO₂ o temperatura, fueron más adecuadas para su crecimiento en las condiciones de cambio climático estudiadas

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN BFU2008-01405 y BFU2011-26989), Fundación Universitaria de Navarra (PIUNA-2008), Fundación Caja Navarra y Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANJUELO I., IRIGOYEN J.J., PÉREZ P., MARTÍNEZ-CARRASCO R. Y SÁNCHEZ-DÍAZ M. (2005) The use of temperature gradient tunnels for studying the combined effect of CO₂, temperature and water availability in N₂ fixing alfalfa plants. *Annals of Applied Biology*, **146**, 51-60.
- AUFÈRE J. Y DEMARQUILLY C. (1989). Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin cellulose methods. *Proceedings of the International Grassland Congress*, pp. 877-878. Nice, France.
- BERTRAND A., PRÉVOST D., BIGRAS F.J., LALANDE R., TREMBLAY G.F., CASTONGUAY Y. Y BÉLANGER G. (2007) Alfalfa response to elevated atmospheric CO₂ varies with the symbiotic rhizobial strain. *Plant and Soil*, **301**, 173-187.
- CAMPBELL B.D., STAFFORD-SMITH D.M. Y GCTE. (2000) Pastures and Rangelands Network members. A synthesis of recent global change research on pasture and rangeland production: reduced uncertainties and their management implications. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **82**, 39-55.
- FISHER D.S., MAYLAND H.F. Y BURNS J.C. (2002) Variation in ruminants preference for tall fescue hays cut either at sundown or at sunup. *Journal of Animal Sciences*, **77**, 762-768.
- IPCC. (2007) Intergovernmental panel on climate change, WMO, UNEP. *Climate change 2007. The physical science basis. Summary for policymakers*. IPCCWGI Fourth Assessment Report. SPM2feb07.
- JARVIS C.E. Y WALKER J.R.L. (1993) Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **63**, 53-57.
- MILCHUNAS D.G., MOISER A.R., MORGAN J.A., LECAIN D.R., KING J.Y. Y NELSON J.A. (2005) Elevated CO₂ and defoliation effects on shortgrass steppe: Forage quality versus quantity for ruminants. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **111**, 166-184.
- SANZ-SÁEZ A., ERICE G., ARANJUELO I., NOGUES S., IRIGOYEN J.J. Y SÁNCHEZ-DÍAZ M. (2010) Photosynthetic down-regulation under elevated CO₂ exposure can be prevented by nitrogen supply in nodulated alfalfa. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 1558-1565.
- UNITED NATIONS POPULATION DIVISION (2010) *World Population Projections to 2150*. New-York: United Nations.
- VAN SOEST P.J. (1994) *Nutritional Ecology of Ruminant*. Ithaca, USA: Cornell University Press.
- VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B. Y LEWIS B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, **74**, 3583-3597.
- YEMM E.W. Y WILLIS A.J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, **57**, 508-514.

