

PASTOS



N.º 45 (1). JUNIO 2015

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DE LOS PASTOS



www.seepastos.es

PASTOS

N.º 45 (1). JUNIO 2015



En portada...

Trifolium incarnatum L.

© Beatriz Rodríguez Vázquez de Aldana

El *Trifolium incarnatum L.* es una leguminosa anual que se utiliza como cultivo invernal. La mejor forma de aprovechamiento es la siega al inicio de la floración. Al margen de las cualidades forrajeras, destaca su colorida inflorescencia formada por 75-125 flores rojo escarlata.

EDITORES PRINCIPALES

Juan Busqué Marcos

Centro de Investigación y Formación Agrarias
del Gobierno de Cantabria
juanbusque@cifacantabria.org

Ramón Reiné Viñales

EPS-Huesca, Universidad de Zaragoza
rreine@unizar.es

EDITORES ASOCIADOS

Botánica-Ecología

Arantza Aldezábal (Universidad del País Vasco)
Segundo Ríos (Universidad de Alicante)

Producción Vegetal

Josep Cifré (Universidad de las Islas Baleares)
Olivia Barrantes (Universidad de Zaragoza)

Producción Animal

Manuel Delgado (Universidad de Sevilla)
Rafael Celaya (SERIDA, Principado de Asturias)

Sistemas Silvopastorales

Javier Ruiz-Mirazo (Pastores por el Monte Mediterráneo)
María Dolores Carbonero (IFAPA, Junta de Andalucía)

Europa

Giuseppe Parente (Universita degli Studi Di Udine)
Guy Beaufoy (European Forum for Nature Conservation
and Pastoralism)

Latinoamérica

Carlos M. Arriaga (Universidad Autónoma del Estado
de México)

ISSN: 2340-1672

Disponibilidad única on line en:

<http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Diseño y maquetación:

MOEBO

© Sociedad Española para el Estudio de los Pastos

SUMARIO

Editorial	4
1. Revisión Científica	5
Hongos endófitos <i>Epichloë</i> en pastos de la península Ibérica	6-18
Beatriz R. Vázquez de Aldana, Milton-Carlos Soto-Barajas e Iñigo Zabalgogea	
2. Artículos Científicos	19
Temporal and spatial flowering patterns in a Supramediterranean pasture-forest community in the Iberian Central System (Spain)	20-35
Miguel Minaya Santa Cruz and Consuelo Cebolla Lozano	
Influencia del pastoreo de alfalfa o esparceta sobre los parámetros productivos y reproductivos de ovejas y corderos	36-46
Sandra Lobón Ascaso, Mireia Blanco Alibés, Albina Sanz Pascua, Pablo José Rufino Moya, Francisco Molino Gahete y Margalida Joy Torrens	
El sorgo grano para ensilar en Galicia como nueva alternativa al maíz forrajero: producción y calidad nutritiva en siembras tardías	47-55
María José Bande Castro, César Resch Zafra y Miguel Quintela García	
3. Reuniones Científicas	56
54 Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (S.E.E.P.). “Pastos y forrajes en el siglo XXI”	57-58
A. Martínez Fernández	
Reseñas de tesis doctorales	59-62
Instrucciones para autores	63-65

Estimados lectores de PASTOS y socios de la SEEP, ponemos a vuestra disposición un nuevo número de la revista, el quinto desde que hemos asumido la responsabilidad de su edición. Contiene un artículo de revisión y tres artículos científicos, combinación que nos parece especialmente atractiva. Comenzamos con una revisión firmada por Vázquez de Aldana y *col.*, sobre la incidencia de la infección de hongos endófitos del género *Epichloë* en pastos ibéricos, sus efectos y consecuencias sobre las plantas hospedadoras y sobre los herbívoros que las consumen. Minaya y Cebolla, en el primero de los artículos científicos nos presentan un minucioso y original estudio sobre los patrones de floración de 113 especies herbáceas de pastos supramediterráneos del Sistema Central. En el segundo artículo científico, pasamos de los aspectos de ecología y botánica de los pastos a una investigación de producción animal escrita por Lobón y *col.*, que analiza las diferencias entre el pastoreo de la alfalfa y el de la esparceta sobre los parámetros productivos y reproductivos de ovejas y corderos. Y finalizamos con Bande y *col.*, con un trabajo de producción vegetal donde estudian una alternativa de cultivo al maíz forrajero: el sorgo grano para ensilar en siembras tardías en la zona de Galicia. Pensamos que una vez más esta selección de trabajos es un fiel reflejo de la diversidad de áreas de conocimiento del ámbito científico de nuestra publicación.

Decíamos al principio que este es el quinto número desde que PASTOS se edita solo en formato digital. Como editores principales, estamos moderadamente satisfechos de lo que vamos consiguiendo en cuanto a calidad de los contenidos, diseño de la revista, plazos de revisión, labor de editores asociados y revisores, etc. Hemos incorporado algunas novedades como los premios que otorga la SEEP a las mejores comunicaciones de las Reuniones Científicas anuales que luego se publican en PASTOS o las reseñas de las tesis doctorales defendidas en España relacionadas con los pastos. Sin embargo no hemos conseguido poner al día nuestra publicación, y necesitamos sacar tres números en los próximos dos años para conseguirlo. Es condición básica para luego poder ser reconocidos y optar, por ejemplo, a las convocatorias que realiza la Fundación Española para la Ciencia y Tecnología (FECYT) de evaluación de la calidad editorial y científica de las revistas científicas españolas. Pasada esta evaluación se pueden conseguir ayudas para fomentar nuestra visibilidad, nuestro proceso de edición y nuestra presencia en las bases de datos internacionales. Este es un reto que no podemos abordar sin vuestra colaboración, fundamentalmente en forma de manuscritos originales para PASTOS, pero también nos gustaría que nos proporcionarais ideas, opiniones, propuestas o apoyos para conseguirlo. Merecería la pena, ¿verdad?

Juan Busqué (juanbusque@cifacantabria.org)

Ramón Reiné (rreine@unizar.es)

Editores Principales de Pastos

1

REVISIÓN CIENTÍFICA



HONGOS ENDÓFITOS *Epichloë* EN PASTOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Beatriz R. Vázquez de Aldana*, Milton-Carlos Soto-Barajas, Iñigo Zabalgozcoa

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC); Cordel de Merinas 40-52; 37008 Salamanca (España)

Epichloë ENDOPHYTES IN PASTURES OF THE IBERIAN PENINSULA

Historial del artículo:

Recibido: 22/12/15

Revisado: 15/03/16

Aceptado: 04/04/16

Disponible online: 20/04/16

* Autor para correspondencia:

beatriz.dealdana@irnsa.csic.es

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Palabras clave:

Gramíneas, alcaloides, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, simbiosis.

RESUMEN

Los hongos endofíticos del género *Epichloë* infectan de forma asintomática numerosas especies de gramíneas. Las plantas infectadas por estos hongos contienen alcaloides tóxicos para herbívoros, y además son más resistentes a diversos factores de estrés biótico y abiótico. Este trabajo es una revisión sobre la incidencia de endófitos *Epichloë* y producción de alcaloides en gramíneas de pastos de la península Ibérica. Además, se consideran los principales efectos que produce *Epichloë* en *Festuca rubra* como gramínea hospedadora (incremento del contenido de nutrientes, efecto en la germinación, efecto en el potencial alelopático y resistencia a patógenos).

Keywords:

Grasses, alkaloids, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, symbiosis.

ABSTRACT

Epichloë fungal endophytes infect asymptotically several grass species. Infected plants produce alkaloids toxic to herbivores and are more resistant to several biotic and abiotic stress factors. In this paper, we review the incidence of *Epichloë* endophytes in grasses from pastures of the Iberian Peninsula and their alkaloid contents. In addition, we address the main effects of *Epichloë* in the host grass *Festuca rubra* (increase in nutrient content, effect on germination, effect on allelopathic potential and pathogen resistance).

INTRODUCCIÓN

En su hábitat natural, las plantas crecen asociadas a un complejo microbioma compuesto principalmente por hongos y bacterias que viven en el interior y exterior de los tejidos vegetales. Los microorganismos patógenos son los mejor conocidos dentro de este grupo, debido a los síntomas que producen en las plantas y al perjuicio que suponen en la agricultura. Sin embargo, los patógenos representan solo un pequeño subconjunto dentro de la totalidad de especies

fúngicas y bacterianas asociadas a plantas (Sánchez Márquez *et al.*, 2012). Otro grupo de microorganismos asociados a plantas que está adquiriendo gran relevancia son los endófitos, hongos y bacterias capaces de infectar el tejido interno de plantas sin causar síntomas aparentes (Hyde y Soyong, 2008; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011). Se han detectado hongos endófitos en todas las especies vegetales que han sido analizadas (Rodríguez *et al.*, 2009). La diversidad de estos hongos es muy elevada; por ejemplo, en la gramínea *Holcus lanatus* L. se han llegado a identificar 134 especies diferentes (Sanchez Márquez *et al.*, 2010).

A pesar de la carencia de síntomas visibles en las plantas, algunas especies endófitas son beneficiosas para sus hospedadores. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el de los hongos *Epichloë*, que infectan varias especies de gramíneas de interés forrajero colonizando el espacio intercelular de hojas, tallos y semillas (Clay y Schardl, 2002; Leuchtmann *et al.*, 2014). Las plantas infectadas por endófitos *Epichloë* contienen alcaloides tóxicos para herbívoros (Bush *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 2000; Scharld *et al.*, 2013a). Además, la asociación con *Epichloë* puede alterar el estado nutricional de la planta y mejorar su competitividad con otras especies vegetales (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013b), así como aumentar la resistencia a factores de estrés abiótico como la sequía o la presencia de metales pesados (Malinowski y Belesky, 2000b; Clay y Schardl, 2002). Debido a los beneficios que estos hongos proporcionan a la planta huésped hay un interés creciente en la utilización de endófitos para la mejora de gramíneas, tanto forrajeras como de uso en céspedes (Oliveira, 1996; Johnson *et al.*, 2013).

El objetivo general de este trabajo de revisión es aportar conocimientos sobre hongos endófitos *Epichloë* que establecen asociaciones con gramíneas, concretamente (1) sobre aspectos generales y características de la asociación entre gramíneas y *Epichloë*, (2) la incidencia de infección por *Epichloë* y contenido de alcaloides en pastos de la península Ibérica y (3) los principales efectos que produce *Epichloë* en *Festuca rubra* como especie hospedadora.

CICLO DE VIDA DE ENDÓFITOS *Epichloë*

La clasificación actual agrupa dentro del género *Epichloë* (Ascomycota) a 34 especies y varias subespecies, incluidos algunos taxones anteriormente clasificados dentro del género *Neotyphodium* (Leuchtmann *et al.*, 2014). Las hifas de *Epichloë* colonizan el espacio intercelular de hojas y tallos, y la planta no muestra ningún síntoma de infección durante su fase vegetativa (Figura 1). Al comenzar la fase reproductiva de la planta, el hongo coloniza el tallo y posteriormente los óvulos, dando lugar a semillas infectadas por el endófito. Resulta así un tipo de transmisión clonal y asexual en la que el mismo genotipo fúngico que infecta a una planta se transmite verticalmente a sus semillas (Figura 2). Las plantas infectadas de esta manera son totalmente asintomáticas durante todo su ciclo de vida. Este tipo de transmisión es muy efectivo, casi todas las semillas que produce una planta están infectadas por el hongo, y al germinar darán lugar a nuevas plantas infectadas. Algunas especies de *Epichloë* como *Epichloë coenophiala* (Morgan-Jones y Gams) Bacon y Schardl (= *Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones y Gams) Glenn, Bacon y Hanlin) o *Epichloë festucae* var. *lolii* (Latch, Chr. y Samuels) Bacon y Schardl (= *Neotyphodium lolii* (Latch, Chr. y Samuels) son asexuales y solamente se transmiten de esta manera.

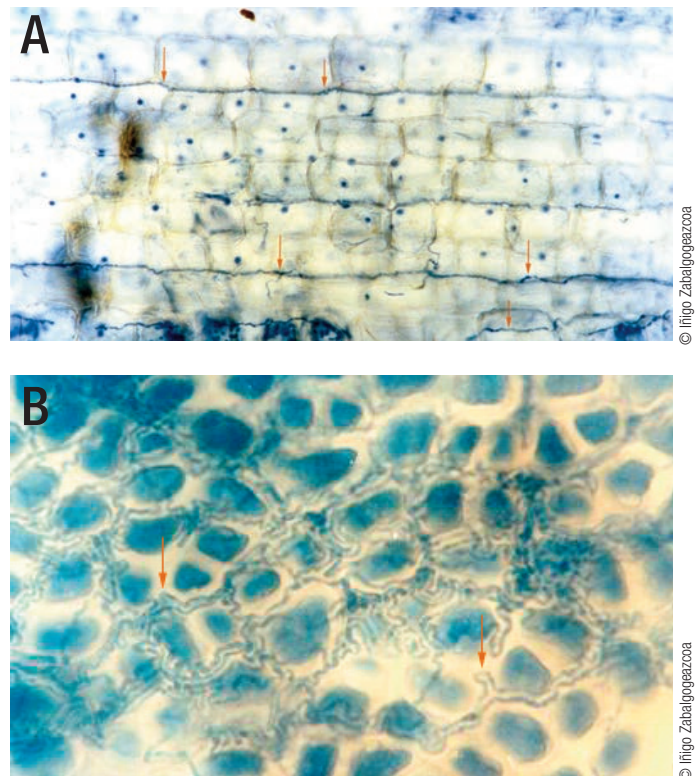


FIGURA 1. Hifas de *Epichloë coenophiala* en vaina foliar (A) y en la capa de aleurona de una semilla (B) de *Lolium arundinaceum* (*Festuca arundinacea*).
FIGURE 1. *Epichloë coenophiala* hyphae in a leaf sheath (A) and in the aleurone layer of a seed (B) of *Lolium arundinaceum* (*Festuca arundinacea*).

La reproducción sexual de ciertas especies del género *Epichloë* se sincroniza con el desarrollo de las inflorescencias de la gramínea huésped (Figura 2). Al iniciarse este estado fisiológico, el hongo empieza a desarrollar una estructura de micelio conocida como estroma que envuelve la inflorescencia inmadura (Figura 3), causando la esterilización del tallo reproductivo (Clay y Schardl, 2002). Algunas especies como *Epichloë typhina* (Pers.) Tul. y Tul. forman estromas en la mayoría de los tallos reproductivos de las plantas infectadas. Tras la fertilización del estroma por una espora asexual compatible, se

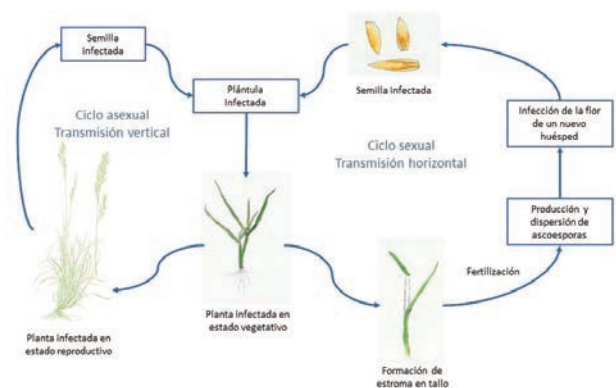


FIGURA 2. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. El ciclo asexual es el predominante.

FIGURE 2. Diagram of the life cycle of *Epichloë*. The asexual cycle is the predominant.

desarrollan fructificaciones que producen esporas capaces de infectar por vía externa los óvulos de otras plantas, dando lugar a semillas infectadas. En el proceso de fertilización de estromas toman parte moscas simbióticas que actúan como vectores de esporas asexuales involucradas en la fertilización (White y Bultman, 1987).

y Raynal, 2001; Nan y Li, 2001). La presencia de *Epichloë* es especialmente frecuente en gramíneas de los géneros *Festuca* y *Lolium* (Leyronas y Raynal, 2001). Las infecciones asintomáticas de *Epichloë* son comunes en *Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbyshire (= *Festuca arundinacea* Scherb.), *Festuca rubra* L. y *Lolium perenne* L. De estas especies se han encontrado plantas infectadas en casi todas las localidades muestreadas, con elevadas tasas de infección, por ejemplo: 67% de las plantas de *Lolium arundinaceum*, (Zabalgoeazcoa et al., 2003). En una colección de semillas de esta especie procedentes del norte de España, se observaron endófitos *Epichloë* en el 90% de las localidades de origen de las muestras, con una incidencia del 7 al 100% (Oliveira et al., 1997). En especies como *Dactylis glomerata* las infecciones sintomáticas son bastante comunes (Zabalgoeazcoa et al., 2003).



FIGURA 3. Estromas de *Epichloë* alrededor de tallos reproductivos de plantas de *Lolium perenne*. El estroma cilíndrico esteriliza el tallo e impide la emergencia de la inflorescencia.

FIGURE 3. *Epichloë* stromata around the reproductive stalks in *Lolium perenne* plants. The cylindrical stromata sterilizes the stem and prevents the emergence of the inflorescence.

INCIDENCIA DE *Epichloë* EN GRAMINEAS DE PASTOS

En un censo para la detección de endófitos *Epichloë* en 50 especies de gramíneas de pastos semiáridos de la provincia de Salamanca, se identificaron 12 especies de gramíneas huéspedes de endófitos *Epichloë* (Zabalgoeazcoa et al., 2003) (Tabla 1). Una proporción similar de especies huéspedes se ha observado en otros países (White y Baldwin, 1992; Leyronas

Festuca rubra es una especie frecuente en los pastos mesofíticos o meso-xerofíticos españoles. En un estudio de seis poblaciones de esta gramínea en pastos de dehesa, se observó que una media del 70% de las plantas estaban infectadas por el endófito *Epichloë festucae* (Zabalgoeazcoa et al., 1999) (Tabla 2). Curiosamente, se detectó la misma tasa de incidencia (70%) en poblaciones de *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* L. en acantilados marinos de la costa gallega (Zabalgoeazcoa et al., 2006b) (Tabla 2). En este hábitat, las plantas a menudo crecen en grietas donde apenas hay suelo en paredes de roca, y están sometidas a estrés salino por la influencia del agua de mar. El hecho de que se haya encontrado el mismo porcentaje de infección en dos hábitats distintos pero estando las plantas en ambos casos sometidas a estrés abiótico, sugiere que el hongo *Epichloë* puede ser un factor importante en la adaptación de estas plantas a un hábitat adverso.

En el oeste de España la incidencia de *Epichloë* en *Lolium perenne* es menor que en *Festuca rubra* (Tabla 2). En las ocho localidades donde se muestrearon plantas de *Lolium* se detectaron endófitos *Epichloë*, con una incidencia media del 43%, oscilando entre el 32-60% (Soto-Barajas et al., 2014). En el norte de España la incidencia parece ser menor, ya que se han detectado plantas de *Lolium* infectadas en el 72% de 54 localidades muestreadas, con una incidencia media del 33% (Oliveira y Castro, 1998).

Gramínea	Endófito	Tipo de interacción	Localidades con infección	Incidencia en la población
<i>Agrostis castellana</i>	<i>Epichloë baconii</i>	Antagonista	3/12	< 5%
<i>Alopecurus arundinaceus</i>	<i>Epichloë</i> sp.	Antagonista	1/18	< 5%
<i>Brachypodium phoenicoides</i>	<i>Epichloë typhina</i>	Antagonista	1/4	< 5%
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	<i>Epichloë sylvatica</i>	Asintomática	1/1	
<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Epichloë typhina</i>	Antagonista	9/9	>40%
<i>Festuca ampla</i>	<i>Epichloë festucae</i>	Mixta	1/1	
<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	Asintomática	9/9	>40%
<i>Festuca ovina</i>	<i>Epichloë festucae</i>	Asintomática	1/1	
<i>Festuca rubra</i>	<i>Epichloë festucae</i>	Asintomática	27/28	>40%
<i>Holcus lanatus</i>	<i>Epichloë typhina</i> subsp. <i>clarkii</i>	Antagonista	3/12	< 5%
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë typhina</i>	Antagonista	3/11	< 5%
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	Asintomática	11/11	>40%

TABLA 1. Gramíneas hospedadoras de endófitos *Epichloë* en pastos de dehesa (Zabalgoeazcoa et al., 2003)

TABLE 1. Host grasses of *Epichloë* endophytes in dehesa grasslands (Zabalgoeazcoa et al., 2003).

<i>F. rubra</i> en pastos de dehesa Zabalgoageazcoa et al. (1999)		<i>F. rubra</i> subsp. <i>pruinosa</i> en acantilados marinos Zabalgoageazcoa et al. (2006)		<i>L. perenne</i> en pastos de diferentes hábitats Soto-Barajas et al. (2014)	
Código localidad	Frecuencia de infección (%)	Código localidad	Frecuencia de infección (%)	Código localidad	Frecuencia de infección (%)
MEM	80	CED	79	CRO	60
LVA	62	PAN	80	DIV	34
ZAR	76	BAR	57	LVA	56
PAL	92	TOR	64	LVE	43
MAT	76			POR	32
PEL	44			POT	44
				TAB	49
				VAF	32
Media	70	Media	70	Media	43

TABLA 2. Incidencia de endófitos *Epichloë* en *Festuca rubra*, *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* y *Lolium perenne* en pastos de diferentes hábitats.

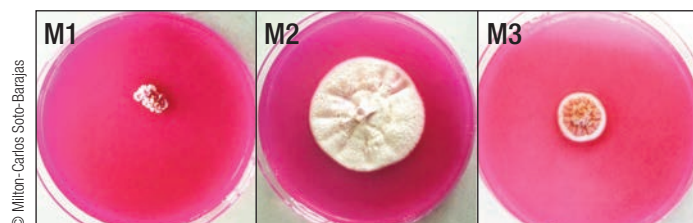
Entre los endófitos *Epichloë* identificados en poblaciones naturales de *L. perenne* por Soto-Barajas et al. (2014), se encontraron tres morfotipos fúngicos predominantes. Dos morfotipos genéticamente cercanos a *E. festucae* var. *lolii* y con ciclo de reproducción asexual, el morfotipo M1, de desarrollo lento, cultivos de color blanco y producción de conidios; y el morfotipo M3, de desarrollo intermedio, cultivos de color marrón claro y micelio estéril (Figura 4). El otro morfotipo, designado M2, corresponde a la especie *E. typhina*, con cultivos de crecimiento rápido, con abundante micelio superficial de color blanco y textura algodonosa, y producción de conidios. En la mitad de las poblaciones estudiadas se encontraron los tres morfotipos. El morfotipo dominante entre poblaciones fue el M1, con más del 50% de los endófitos analizados pertenecientes a este grupo, una tercera parte de los aislados pertenecían al grupo M3 y una menor cantidad al morfotipo M2.

TABLE 2. Incidence of *Epichloë* endophytes in *Festuca rubra*, *Festuca rubra* subsp. *pruinosa* y *Lolium perenne* in pastures from different habitats.

ALCALOIDES PRODUCIDOS POR HONGOS *Epichloë*

Una de las principales características de las asociaciones gramínea-*Epichloë* es la producción de alcaloides que proporcionan a la planta hospedadora resistencia frente a herbívoros (Bush et al., 1997; Lane et al., 2000; Schardl et al., 2013a). Los alcaloides que pueden producir los endófitos *Epichloë* en la planta huésped son de cuatro tipos: alcaloides del grupo ergot y lolitrenos, tóxicos para el ganado; y peramina y lolinas, con actividad insecticida y baja toxicidad para mamíferos (Figura 5).

El principal alcaloide del grupo ergot asociado a *Epichloë* es la ergovalina. Este compuesto es causante de la festucosis, un síndrome tóxico que afecta al ganado vacuno y en menor medida al equino y ovino. Algunos de sus síntomas son el aumento de la temperatura corporal, pérdida de peso, aspereza en el pelo, disminución de la producción de leche y de la eficiencia reproductiva, vasoconstricción y en ciertos casos gangrena en las extremidades (Schmidt y Osborn, 1993; Olivier, 2005). Además en pastos infectados por *Epichloë* la ganancia media diaria de peso en vacuno puede llegar a disminuir hasta un 44% (Paterson et al., 1995).



M1 = morfotipo de desarrollo lento, cultivos de color blanco y producción de conidios. M2= morfotipo de crecimiento rápido, con abundante micelio superficial de color blanco y de textura algodonosa y producción de conidios. M3= morfotipo de crecimiento intermedio, cultivos de color marrón claro y micelio estéril.

FIGURA 4. Morfología de endófitos *Epichloë* aislados de plantas de *Lolium perenne*.

FIGURE 4. Morphology of *Epichloë* endophytes isolated from plants of *Lolium perenne*.

Las infecciones víricas son relativamente comunes en numerosas especies de hongos. A menudo, estas infecciones no están asociadas a síntomas obvios en los hongos huéspedes de virus. Este es el caso de dos virus que se han identificado en el endófito *Epichloë festucae* (Romo et al., 2007). Cerca del 80% de los aislados de *E. festucae* que infectan plantas de *Festuca rubra* en pastos de dehesa están infectados por los virus EFV1 y EFV2. Sin embargo, no se ha descubierto ningún parámetro del hongo huésped que establezca una diferencia entre aislados infectados y no infectados.

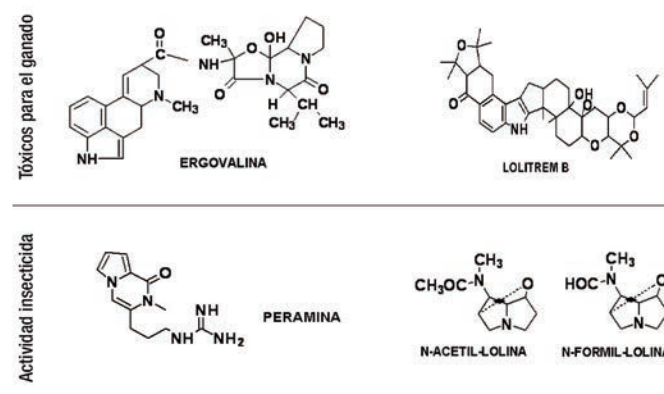


FIGURA 5. Estructura de los cuatro tipos de alcaloides encontrados en gramíneas infectadas por endófitos *Epichloë*.

FIGURE 5. Structure of the four types of alkaloids found in grasses infected by *Epichloë* endophytes.

El lolitrem B, un indol-diterpeno, es una neurotoxina que produce en el ganado una serie de trastornos conocidos comúnmente como toxicosis del raigrás (*perennial ryegrass toxicosis*). Los síntomas incluyen la parálisis del raigrás (*ryegrass staggers*), un síndrome tóxico que se caracteriza por temblores agudos en el cuello y extremidades, y una disminución de la función neuromuscular (Gallagher *et al.*, 1984). Otros síntomas son choques térmicos y pérdida de productividad y mortalidad (Reed *et al.*, 2011). Afecta principalmente a ganado ovino, pero también se han detectado dichos efectos en ciervos, camellos, alpacas, cabras y rinoceronte blanco, así como en ganado vacuno y caballo (Hume, 2015).

La mayoría de los casos de toxicidad registrados en ganado por el consumo de pastos han ocurrido en países donde se cultivan praderas mono-específicas de gramíneas con elevadas tasas de incidencia de *Epichloë*. Este es el caso de *L. arundinaceum* en EEUU, donde la extensión de este cultivo llega a 14 millones de hectáreas y se producen unas pérdidas económicas anuales en la producción de ganado vacuno estimadas en 1 000-1 500 millones de dólares (Hume, 2015). En Argentina, debido a la introducción de la *Festuca arundinacea*, se producen pérdidas anuales de 54 millones de dólares (Hume, 2015). Otro caso similar es el de la infección de *L. perenne*, que ocasiona pérdidas importantes en el sector ganadero en Nueva Zelanda, Australia y Chile. Así por ejemplo, en 2002 murieron casi 100 000 cabezas de ganado, principalmente ovino, en Australia (Hume y Sewell, 2014). Este tipo de sucesos son ocasionales, pero desde 1985 se han producido tres episodios de intoxicación masiva. Las pérdidas económicas ocasionadas por la parálisis del raigrás en productores australianos de ovino y vacuno de carne han sido estimadas en 100 millones de dólares AUD (Hume y Sewell, 2014).

En Europa se conocen muy pocos casos de intoxicaciones por consumo de pastos infectados por *Epichloë*. Esto es debido (i) al mayor uso de pastos naturales, cuya diversidad florística produce un efecto de dilución de las toxinas en la dieta consumida por el ganado, (ii) a que desde hace décadas, son muy pocas las variedades comerciales de gramíneas forrajeras (i.e. *L. perenne*, *L. arundinaceum*) cuya semilla está infectada por *Epichloë*, y (iii) al poco uso de algunas especies huéspedes como *L. arundinaceum* en praderas artificiales en Europa (Oliveira, 1996; Zabalgoeazcoa *et al.*, 1998; Zabalgoeazcoa y Bony, 2008). No obstante, ciertos cultivares de *L. arundinaceum* infectados, pueden tener una elevada concentración de ergovalina en semillas (Vázquez de Aldana *et al.*, 2001). En los últimos años se han detectado casos de toxicidad en Irlanda y Francia que podrían estar relacionados con el aumento de los periodos de sequía (Zabalgoeazcoa y Bony, 2008).

La peramina, un alcaloide del grupo de las pirrolopirazinas, tiene actividad insecticida pero no es tóxica para el ganado. La peramina aumenta la resistencia de las plantas infectadas

frente a numerosos insectos y nematodos (Clay y Schardl, 2002). En Nueva Zelanda la presencia de este alcaloide es crucial para la protección de los pastos de *Lolium perenne* contra el escarabajo *Listronotus bonariensis* Kuschel que ataca la base de los tallos de la planta (Rowan y Gaynor, 1986). Las lolinas tienen actividad insecticida contra varias especies de insectos y nematodos, y están directamente relacionadas con la resistencia de las plantas huéspedes a ciertas especies de pulgones (Wilkinson *et al.*, 2000; Schardl *et al.*, 2007).

El perfil de alcaloides de una planta depende de la especie de gramínea hospedadora y del hongo que la infecta, así como de factores ambientales. En una misma planta se han encontrado hasta tres alcaloides fúngicos diferentes, pero hasta la fecha no se ha descubierto ninguna con los cuatro tipos. La peramina, con actividad insecticida, es el alcaloide más frecuente en las distintas especies huéspedes, y el grupo de las lolinas el menos frecuente (Siegel y Bush, 1996; Schardl *et al.*, 2013b). *Epichloë* promueve la síntesis de lolitrem B solo en asociaciones con *L. perenne*, mientras que la ergovalina se ha detectado en plantas infectadas de *L. arundinaceum*, *L. perenne* o *F. rubra*. Recientemente se han identificado los genes implicados en la ruta de biosíntesis de los cuatro alcaloides (Schardl *et al.*, 2013b; 2014).

Además de la variación del perfil de alcaloides por efecto del genotipo del hongo y de la planta, la concentración puede verse afectada por otros factores como el estado fenológico y el tipo de tejido de la planta, así como por condiciones de manejo como el abonado y disponibilidad de agua (Lane *et al.*, 2000). Cada alcaloide tiene un modelo de distribución; por ejemplo, la concentración de ergovalina tiende a aumentar con la madurez de la planta, y las concentraciones más elevadas se encuentran en las semillas (Ball *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2002; Vázquez de Aldana *et al.*, 2003). En plantas de *L. perenne* la mayor concentración de lolitrem B se encuentra en la zona basal, que es consumida por ganado ovino principalmente durante los meses de verano (Ball *et al.*, 1995). Esto explicaría por qué el ganado vacuno, que no pastorea tan bajo como el ovino, no padece el síndrome de la parálisis del raigrás. Por otro lado, la acumulación de peramina, alcaloide con actividad insecticida, es mayoritaria en las hojas, la parte consumida por insectos. Esta distribución sugiere que los alcaloides se acumulan en las partes de la planta más susceptibles de ser atacadas o dañadas por herbívoros, y puede ser considerada como un sistema de protección que asegura la supervivencia y diseminación del hongo.

La concentración de alcaloides en la planta puede variar con algunos factores ambientales. Así por ejemplo, varios trabajos han mostrado que al disminuir la disponibilidad hídrica aumenta la concentración de ergovalina (tóxico para el ganado) en plantas de *L. arundinaceum*, *L. perenne* o *F. rubra* (Belesky *et al.*, 1989; Hahn *et al.*, 2008; Vázquez de Aldana *et al.*,

Gramínea	Ergovalina (mg/kg)	Hábitat	Referencia
<i>Agrostis castellana</i>	0	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2003)
<i>Brachypodium phoenicoides</i>	0	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2003)
<i>Dactylis glomerata</i>	0	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2003)
<i>Holcus lanatus</i>	0	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2003)
<i>Festuca arundinacea</i>	0,1–3,2	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2003)
<i>Festuca ovina</i>	0,11	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2003)
<i>Festuca rubra</i>	0–0,47	Dehesa	Vazquez de Aldana et al., (2010)
<i>Festuca rubra pruinosa</i>	0–1,9	Acantilados	Vazquez de Aldana et al., (2007)
<i>Lolium perenne</i>	0-5,0	Oeste de la P. Ibérica (dehesa y otros)	Soto-Barajas et al., (2015)
<i>Lolium perenne</i>	0-0,55	Norte España	Oliveira et al., (2003)

TABLA 3. Concentración del alcaloide ergovalina en gramíneas infectadas por endófitos *Epichloë* procedentes de pastos.

2013a). Por tanto, en condiciones de sequía puede aumentar el riesgo de toxicidad para el ganado en pastoreo. Otro factor que puede afectar a la concentración de alcaloides en la planta es la adición de abono. Un aumento del nivel de fósforo en suelo (de 17 a 50 mg/kg) puede aumentar la concentración de ergovalina en plantas de *L. arundinaceum* (Malinowski et al., 1998b). La adición de compuestos nitrogenados también aumenta la concentración de alcaloides como ergovalina, siendo mayor el incremento producido por formas NO_3^- que por NH_4^+ (Arechavaleta et al., 1992.). Igualmente, la combinación de los factores antes mencionados con incrementos de temperatura, producen un aumento en la planta de los niveles de alcaloides tóxicos para el ganado lolitrem B y ergovalina, según se ha observado en *L. arundinaceum* infectada con *E. cenophiala* y en *L. perenne* en simbiosis con *E. festucae* var. *lolii* (Ryan et al., 2015).

ALCALOIDES EN PASTOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

En gramíneas de pastos de dehesa de la provincia de Salamanca, las especies *Festuca rubra*, *Festuca ovina* L., *Lolium arundinaceum* y *Lolium perenne* producen ergovalina, alcaloide tóxico para mamíferos, en concentraciones variables (Vázquez de Aldana et al., 2003, 2007, 2010) (Tabla 3). La mayoría de las plantas analizadas presentaron concentraciones por debajo del nivel crítico de 0,40 mg/kg en la dieta, por encima del cual se observan síntomas clínicos de festucosis en ganado vacuno (Aldrich et al., 1993). En gramíneas como *Agrostis castellana* Boiss y Reut., *Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. y Schult., *Dactylis glomerata* y *Holcus lanatus* L., infectadas por *E. typhina*, *Epichloë typhina* subsp. *clarkii* (White) Leuchtm. y Schardl y *Epichloë baconii* White, no se detectó dicho alcaloide. Curiosamente, las concentraciones más altas de ergovalina que se han detectado ocurren en plantas de *F. rubra* subsp. *pruinosa* procedentes de acantilados marinos (Tabla 3), donde la prevalencia de *Epichloë* es del 70% (Vázquez de Aldana et al., 2007).

En poblaciones de *F. rubra* asociadas a *Epichloë*, la producción y concentración de los alcaloides ergovalina y peramina presentan variaciones importantes tanto entre plantas

TABLE 3. Concentration of ergovaline alkaloid in grasses infected by *Epichloë* endophytes from pastures.

como entre poblaciones. Así, dentro de una población no todas las plantas infectadas producen cantidades detectables de estos metabolitos secundarios. En una de las poblaciones estudiadas (PAL) se encontró que un 75% de las plantas producía ergovalina y un 33% peramina; mientras que en la otra población (SER) sucedía lo contrario, un 33% producía ergovalina y un 80% peramina (Vázquez de Aldana et al., 2010) (Figura 6). En dichas poblaciones se detectó mayor diversidad genética entre hongos *Epichloë* en plantas de distintas poblaciones que entre los de la misma población (Arroyo Garcia et al., 2002). Entre plantas infectadas con endófitos de *E. festucae* genéticamente próximos existe una tendencia a producir concentraciones similares de peramina, mientras que la variación en el contenido de ergovalina parece depender más de factores externos que de la distancia genética entre los endófitos (Vázquez de Aldana et al., 2010). El hecho de que la ruta de biosíntesis de peramina sea bastante más simple que la de ergovalina (Schardl et al., 2013b) podría explicar la mayor estabilidad de la producción del primer alcaloide.

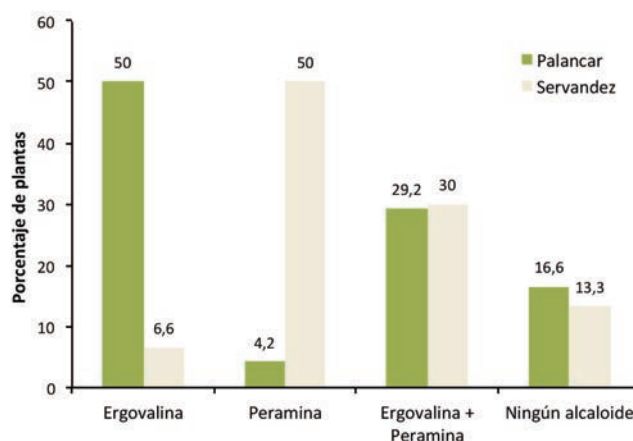


FIGURA 6. Porcentaje de plantas de *Festuca rubra* asociadas a *Epichloë festucae* que producen los alcaloides ergovalina (tóxico para ganado) y peramina (actividad insecticida), en Palancar y Servandez, dos dehesas de la provincia de Salamanca (© Wiley Library; Vázquez de Aldana et al., 2010).

FIGURE 6. Percentage of *Festuca rubra* plants infected by *Epichloë festucae* that produce the alkaloids ergovaline (toxic to livestock) and peramine (insecticide), in Palancar and Servandez, two meadows in the province of Salamanca (© Wiley Library; Vázquez de Aldana et al., 2010).

La concentración de alcaloides en *L. perenne* puede depender del grupo taxonómico de *Epichloë* (Soto Barajas *et al.*, 2015). En un análisis de plantas de diferentes hábitats, se encontró que el 80% de las plantas producía peramina y el 63% lolitrem B. En plantas con estromas característicos de *E. typhina*, (Figura 3), se detectaron las concentraciones más altas de peramina; mientras que en plantas asintomáticas con endófitos de morfotipo M1 y M3 se observaron las concentraciones más elevadas de lolitrem B (Soto Barajas *et al.*, 2015) (Figura 7). En menos del 10% de las plantas se sobrepasó el nivel crítico en la dieta de 1,80 mg/kg, a partir del cual se observan síntomas en el ganado (Turner *et al.*, 1995). En poblaciones silvestres de *L. perenne* del norte de España se han detectado concentraciones de lolitrem B de 0-7,1 mg/kg en semilla, y ergovalina en concentraciones de 0-0,55 mg/kg en planta y de 1,0-36,2 mg/kg en semilla (Oliveira *et al.*, 1997, 2003).

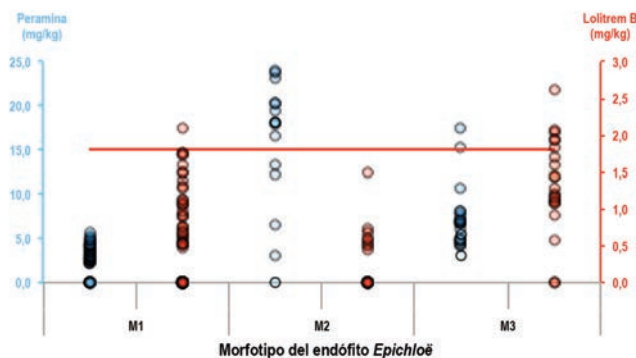


FIGURA 7. Concentración de los alcaloides peramina (insecticida) y lolitrem B (tóxico para ganado) en plantas de *Lolium perenne* infectadas por *Epichloë*, procedentes de pastos del oeste español, en función del morfotipo (M1, M2 y M3) del endófito (Soto-Barajas *et al.*, 2015).

FIGURE 7. Concentration of alkaloids peramine (insecticide) and lolitrem B (toxic to cattle) in *Lolium perenne* plants infected by *Epichloë*, from pastures of Western-Spain, as affected by the taxonomic group of the endophyte (Soto-Barajas *et al.*, 2015).

LA SIMBIOSIS MUTUALISTA ENTRE *Festuca rubra* Y *Epichloë festucae*

Varios trabajos han mostrado que las plantas infectadas por *Epichloë*, además de la resistencia a herbívoros que confieren los alcaloides, también tienen mayor resistencia a factores de estrés abiótico como la sequía o la presencia de metales pesados (Malinowski y Belesky, 2000b; Clay y Schardl, 2002). El hecho de que en los pastos semiáridos de dehesas de la provincia de Salamanca, un 70% de las plantas de *F. rubra* estén infectadas por el endófito *E. festucae* indica la posibilidad de que el hongo produzca algún beneficio a la planta, ya que el coste metabólico que le supone mantener al hongo en su interior puede ser elevado en dicho hábitat. Algunas plantas infectadas de *F. rubra* contienen

alcaloides como ergovalina o peramina, aunque la concentración detectada del alcaloide ergovalina es muy baja y con variaciones interanuales que pueden llegar a concentración cero (Vázquez de Aldana *et al.*, 2010). Estas bajas concentraciones de alcaloides detectadas en poblaciones silvestres de *F. rubra* con una alta incidencia de *Epichloë*, podrían indicar que la selección natural que favorecería una alta prevalencia del hongo, no opera exclusivamente sobre plantas con resistencia a herbívoros por su contenido de alcaloides, sino que otros aspectos pueden verse afectados, como se explica en los siguientes apartados.

Epichloë incrementa el contenido de nutrientes en *Festuca rubra*

Varios estudios llevados a cabo con diferentes ecotipos silvestres de *F. rubra* han mostrado que la presencia de *Epichloë* puede incrementar de forma significativa el contenido de fósforo en la planta. Un ensayo de campo con cinco ecotipos de *F. rubra* mostró durante tres años consecutivos un aumento significativo del 11,2% en la concentración de P en las plantas asociadas a *Epichloë* (Figura 8), aunque las diferencias en producción de biomasa entre plantas simbióticas y plantas no infectadas no fueron significativas (Zabalgogezcoa *et al.*, 2006a). En un ensayo en invernadero con dos ecotipos de *F. rubra* y varios tratamientos de disponibilidad de agua, se detectó un incremento en la concentración de P (62%) y de Zn (58%) en plantas con *Epichloë*; dicho aumento fue significativo en todos los tratamientos hídricos (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013a) (Figura 9). Estos resultados sugieren que, aunque *Epichloë* coloniza el tejido aéreo de la planta pero no la raíz, el hongo puede modificar procesos que impliquen una mayor absorción de nutrientes. Alternativamente, este efecto podría deberse a

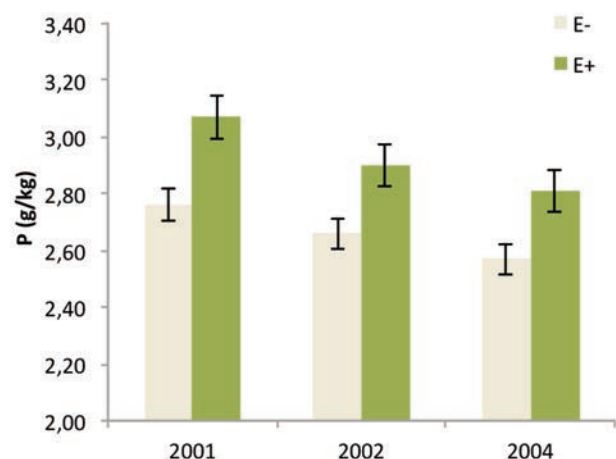


FIGURA 8. Contenido de fósforo en plantas de *Festuca rubra* infectadas por *E. festucae* (E+) y no infectadas (E-), en un ensayo de campo, durante tres años (© Elsevier, Zabalgogezcoa *et al.*, 2006).

FIGURE 8. Phosphorus content in plants of *Festuca rubra* infected by *E. festucae* (E+) and non-infected (E-), in a field trial during three years (© Elsevier, Zabalgogezcoa *et al.*, 2006)

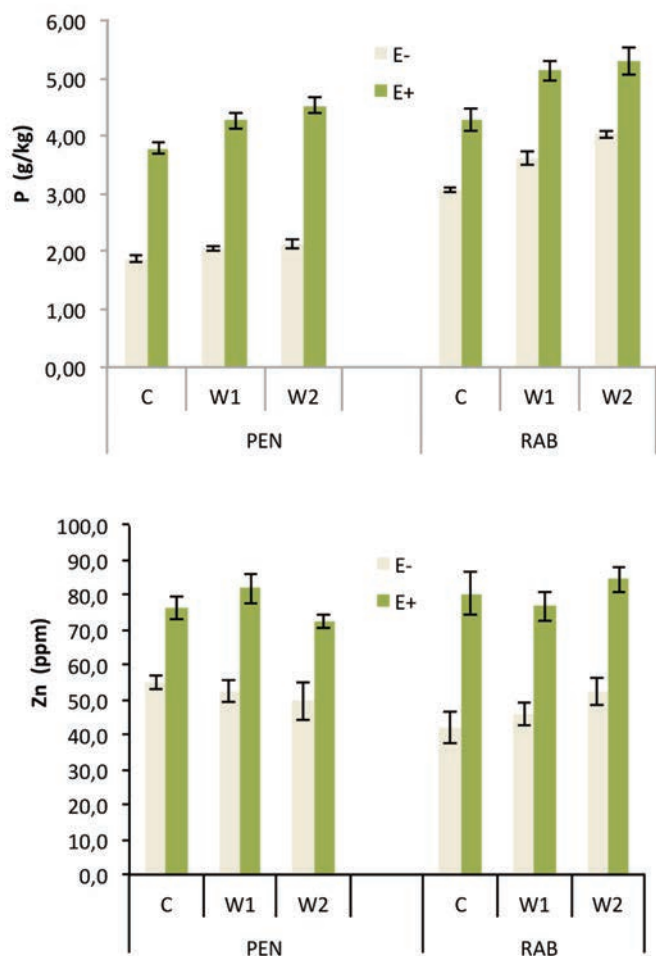


FIGURA 9. Contenido de P y Zn en dos ecotipos (PEN y RAB) de *Festuca rubra* infectados por *Epichloë* (E+) y sin *Epichloë* (E-) creciendo con distinta disponibilidad de agua (C = control, riego regular; W1 = riego una vez por semana; W2 = riego una vez cada dos semanas). (© PLoSOne, Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

FIGURE 9. P and Zn content in two ecotypes (PEN and RAB) of *Festuca rubra* infected by *Epichloë* (E+) and without *Epichloë* (E-) growing with different water availability regimes (C = control, regular watering; W1 = watering once a week; W2 = watering once every two weeks). (© PLoSOne, Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

un aumento de la acumulación de P en tejido foliar de plantas infectadas. En las raíces de las plantas del ensayo de invernadero no se detectó colonización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), lo que indica que el efecto podría atribuirse a *Epichloë*. En las raíces de las plantas de campo se detectaron HMA, tanto en las infectadas por *Epichloë* como en las no asociadas a *Epichloë*. Varios trabajos sobre *L. perenne* y *L. arundinaceum* han mostrado que la colonización de HMA es menor en raíces de plantas asociadas a *Epichloë* que en las no infectadas (Guo *et al.*, 1992; Omacini *et al.*, 2006). Sin embargo, otros estudios con gramíneas del género *Bromus* han mostrado lo contrario: una mayor frecuencia de colonización en raíces de plantas infectadas con *Epichloë* que en las no infectadas (Novas *et al.*, 2005).

Efecto de *Epichloë* en la germinación

El efecto de *E. festucae* en la germinación de semillas de *F. rubra* se ha estudiado considerando diferentes temperaturas (12°C y 25°C) y potencial hídrico (0 y 0,5 Mpa) (Gundel *et al.*, 2011). En general el porcentaje de germinación fue más alto en el caso de las semillas E- que en las infectadas (E+). Sin embargo, se encontró un efecto positivo del endófito en la supervivencia de las semillas E+, especialmente en los tratamientos menos favorables para la germinación. Así en el tratamiento más restrictivo para esta especie, según se indica en el trabajo, (25°C y -0,5 MPa) la supervivencia de semillas fue superior en las E+ (44%) que en las E- (39%).

La presencia de *Epichloë* puede afectar el rendimiento de algunos genotipos de *F. rubra* que crecen en suelos que contienen metales pesados como el arsénico. Aunque la germinación de semillas en suelos con distintas concentraciones de As no se ha visto afectada por la presencia de *Epichloë*, el crecimiento de la radícula de las plántulas E+ es mayor que el de las plantas E- en todos los niveles de As (Vázquez de Aldana *et al.*, 2014).

La presencia de endófitos *Epichloë* puede modificar el potencial alelopático de *Festuca rubra*

La alelopatía es la ciencia que estudia cualquier proceso que involucre compuestos químicos (preferentemente metabolitos secundarios) de origen vegetal o microbiano, que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos. Se trata de un tipo de interacción entre plantas que tiene interés tanto desde el punto de vista básico (estructura dinámica de comunidades vegetales) como aplicado, ya que determinadas plantas con actividad alelopática pueden considerarse como herbicidas naturales (Macías *et al.*, 2007).

La presencia de *Epichloë* puede modificar el potencial alelopático en la planta hospedadora. Estudios realizados con extractos acuosos de distintos tejidos de *F. rubra* con *Epichloë* (E+) y sin *Epichloë* (E-) mostraron que el crecimiento de plántulas de especies pratenses como *Lotus corniculatus* L., *Plantago lanceolata* L., *Trifolium pratense* L. o *Trifolium repens* L., sufre una mayor inhibición cuando los extractos proceden de raíces de plantas E+ (Vázquez de Aldana *et al.*, 2011). En los extractos de plantas E+ se encontró una mayor concentración de compuestos fenólicos, cuya actividad alelopática es conocida (Inderjit, 1996). Posteriormente, en un ensayo con mezclas binarias de *F. rubra* y *Trifolium pratense* se detectó que el crecimiento de *Trifolium* era significativamente menor en compañía de *F. rubra* asociada a *Epichloë* (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013b) (Figura 10). Esta disminución en el crecimiento de la leguminosa no fue debida a diferencias en el desarrollo de *F. rubra* (E+ versus E-). Todos estos resultados muestran que *Epichloë* incrementa el potencial alelopático de

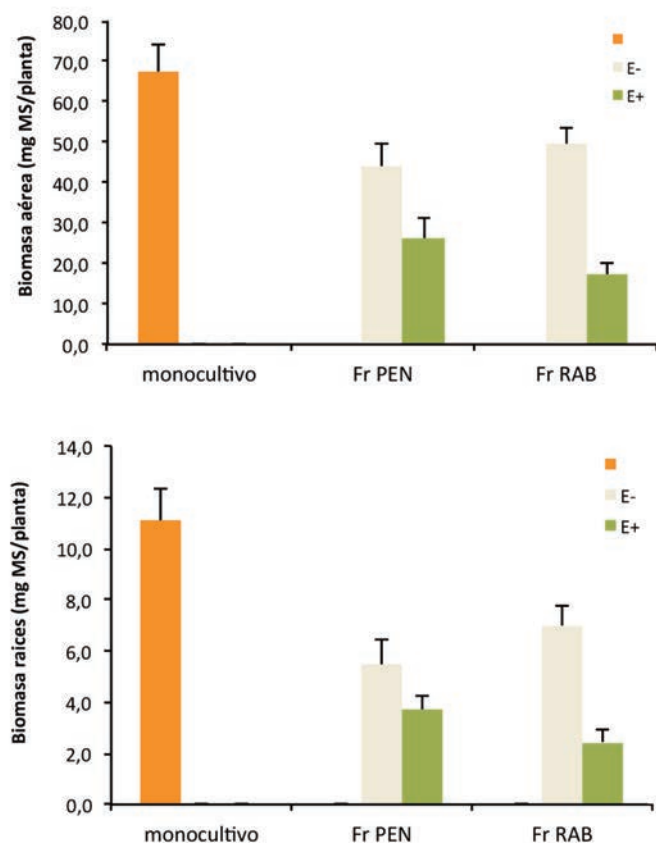


FIGURA 10. Producción de biomasa aérea y subterránea de plantas de *Trifolium pratense* en monocultivo y en mezcla con *Festuca rubra* infectada por *Epichloë* (E+) y no infectada (E-) de dos ecotipos diferentes (PEN y RAB). La inhibición del crecimiento de *T. pratense* es mucho mayor en co-cultivo con plantas infectadas de *F. rubra*. © Springer; Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

FIGURE 10. Aboveground and belowground biomass production of plants of *Trifolium pratense* in monoculture and mixed with *Festuca rubra* *Epichloë* (E+) -infected and not infected (E-) of two different ecotypes (PEN and RAB). The inhibition of the growth of *T. pratense* is much greater when mixed with infected plants of *F. rubra* (© Springer; Vázquez de Aldana *et al.*, 2013).

F. rubra, y que la producción de compuestos fenólicos puede estar implicada en este incremento (Vázquez de Aldana *et al.*, 2013b).

Además de la actividad alelopática, los compuestos fenólicos pueden incrementar la absorción de fósforo en la planta mediante la formación de complejos con Al, Fe y Mn. Por tanto, la mayor concentración de P encontrada en plantas con *Epichloë*, tanto en *F. rubra* como *L. arundinaceum* (Malinowski *et al.*, 2000a; Zabalgoeazcoa *et al.*, 2006a; Vazquez de Aldana *et al.*, 2013a) podría deberse a una mayor secreción de exudados por la raíz, incluyendo compuestos fenólicos (Malinowski *et al.*, 1998a; Vazquez de Aldana *et al.*, 2011). Así, la presencia de *Epichloë* en el tejido aéreo de las plantas podría afectar a varios procesos del ecosistema (Figura 11). Una modificación cualitativa o cuantitativa de exudados por la raíz, además de los efectos alelopáticos, puede implicar modificaciones en la microbiología del suelo (Omacini *et al.*, 2012). Los cambios en la concentración de nutrientes

en las plantas podría alterar la calidad de hojarasca producida por tejidos senescentes y por tanto las tasas de descomposición (Omacini *et al.*, 2004).

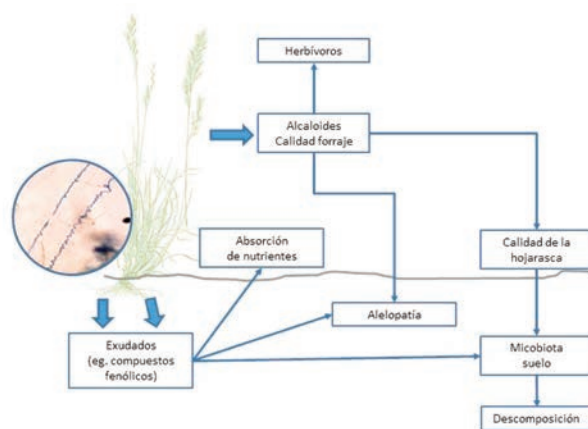


FIGURA 11. Esquema de los impactos potenciales que los endófitos *Epichloë* pueden producir en el funcionamiento del ecosistema.

FIGURE 11. Scheme of the potential impacts that *Epichloë* endophytes may have in the functioning of the ecosystem.

Resistencia a patógenos asociada a endófitos *Epichloë*

La asociación de gramíneas con endófitos *Epichloë* afecta a varios aspectos relacionados con la respuesta de las plantas frente a factores de estrés biótico y abiótico. Los posibles beneficios obtenidos por plantas simbióticas frente a ataques de patógenos han sido estudiados en varios patosistemas (Zabalgoeazcoa, 2008).

Respecto a ataques de hongos patógenos, se ha observado una reducción considerable de la severidad de la enfermedad de la mancha del dólar, causada por *Sclerotinia homoeocarpa*, en diversas variedades de *F. rubra* infectadas por *E. festucae*. El efecto beneficioso del endófito se detectó durante varios años consecutivos en experimentos de campo (Clarke *et al.*, 2006). La simbiosis endofítica también redujo la severidad de la enfermedad del hilo rojo, causada por *Laetisaria fuciformis* (Bonos *et al.*, 2005). Algunos estudios también han mostrado una mejora de la resistencia a varias especies de nematodos en plantas de *Lolium arundinaceum* infectadas por *Epichloë coenophiala* (West *et al.*, 1988; Kimmons *et al.*, 1990). Los endófitos *Epichloë* no infectan raíces de plantas, y por tanto se ha atribuido la mejora del rendimiento de estas plantas simbióticas a la translocación de compuestos antiherbívoros de origen fúngico (i.e. alcaloides). Sin embargo, aún queda por concretar qué compuesto o mecanismo es responsable de esta mejora del rendimiento frente a nematodos. Indirectamente, a través de la interferencia con insectos vectores, las gramíneas asociadas a endófitos también podrían beneficiarse frente a la transmisión de virus (Lehtonen *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Los hongos endófitos *Epichloë* son frecuentes en varias gramíneas de pastos de la península ibérica. Se han identificado hongos *Epichloë* en un 24% de las especies de gramíneas analizadas, y las frecuencias de infección son elevadas en poblaciones naturales de *Festuca rubra*, *Lolium arundinaceum* y *Lolium perenne*. En plantas infectadas por *Epichloë* procedentes de pastos, se han detectado los alcaloides ergovalina y lolitrem B (tóxicos para ganado) y peramina (actividad insecticida), en concentraciones que varían entre poblaciones para una misma especie de gramínea. Hasta la fecha no se han diagnosticado en España casos de intoxicación en ganado vacuno u ovino producidos por el consumo de pastos infectados por *Epichloë*. Hay un gran interés en el uso de endófitos para la mejora de gramíneas forrajeras, que se basa en la selección de aislados con una baja producción de ergovalina y lolitrem B, pero que contengan peramina. Varios estudios han mostrado que la asociación con *Epichloë* es beneficiosa para las plantas, y en determinadas condiciones de crecimiento puede aumentar su contenido en nutrientes (ej. fósforo), aumentar su potencial alelopático o la resistencia a patógenos, en relación a las plantas no infectadas por *Epichloë*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos del Plan Nacional I+D+i (AGL2011-22783) y del Plan Regional de la Junta de Castilla y León (CSI231U14). Agradecemos a todo el personal del Grupo de Pastos del IRNASA-CSIC que ha trabajado en los diferentes proyectos y ensayos cuyos resultados se presentan aquí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH C.G., PATERSON J.A., TATE J.L. Y KERLEY M.S. (1993) The effects of endophyte-infected tall fescue consumption on diet utilization and thermal regulation in cattle. *Journal of Animal Science*, 71, 164-170.
- ARECHAVALETA M., BACON C.W., PLATTNER R.D., HOVELAND C.S. Y RADCLIFFE D.E. (1992) Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 857-861.
- ARROYO GARCIA R., MARTINEZ ZAPATER J.M., GARCIA CRIADO B. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2002) Genetic structure of natural populations of the grass endophyte *Epichloë festucae* in semiarid grasslands. *Molecular Ecology*, 11, 355-364.
- BALL O.J.P., MILES C.O. Y PRESTIDGE R.A. (1997) Ergopeptide alkaloids and *Neotyphodium lolii*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychus* arator (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology*, 90, 1382-1391.
- BALL O.J.P., PRESTIDGE R.A. Y SPROSEN J.M. (1995) Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1527-1533.
- BELESKY D.P., STRINGER W.C. Y PLATTNER R.D. (1989) Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions. II. Pyrrolizidine and ergopeptide alkaloids. *Annals of Botany*, 64, 343-349.
- BONOS S.A., WILSON M.M., MEYER W.A. Y FUNK C.R. (2005) Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. *Applied Turfgrass Science*, 2. doi:10.1094/ATS-2005-0725-01-RS.
- BUSH L.P., WILKINSON H.H. Y SCHARDL C.L. (1997) Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, 114: 1-7.
- CLARKE B.B., WHITE J.F., HURLEY H., TORRES M.S., SUN S. Y HUFF D.R. (2006) Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*, 90, 994-998.
- CLAY K. Y SCHARDL C. (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160, S99-S127.
- GALLAGHER R.T., HAWKES A.D., STEYN P.S. Y VLEGGAR R. (1984) Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorders of livestock. Structure elucidations of lolitrem B. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 9, 614-616.
- GUNDEL P.E., ZABALGOGEAZCOA I. Y VÁZQUEZ DE ALDANA B.R. (2011) Interaction between plant genotype and the symbiosis with *Epichloë* fungal endophytes in seeds of red fescue (*Festuca rubra*). *Crop and Pasture Science*, 62, 1010-1016.
- GUO B., HENDRIX J., AN Z. Q. Y FERRISS R. (1992) Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 84, 882-885.
- HAHN H., MCMANUS M.T., WARNSTORFF K., MONAHAN B.J., YOUNG C.A., DAVIES E., TAPPER B.A. Y SCOTT B. (2008) *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 183-199.
- HUME D.E. (2015) Utilising *Epichloë*-grass associations to benefit livestock production systems. En: 9th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses. Agrobio, La Trobe University, pp 39. Bundoora Melbourne Victoria, Australia.
- HUME D.E. Y SEWELL J.C. (2014) Agronomic advantages conferred by endophyte infection of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in Australia. *Crop and Pasture Science*, 65, 747-757.
- HYDE K.D. Y SOYTONG K. (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163-173.
- INDERJIT (1996) Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review*, 62, 186-202.

- JOHNSON L.J., DE BONTH A.C.M., BRIGGS L.R., CARADUS J.R., FINCH S.C., FLEETWOOD D.J., FLETCHER L.R., HUME D.E., JOHNSON R.D., POPAY A.J., TAPPER B.A., SIMPSON W.R., VOISEY C.R. Y CARD S.D. (2013) The exploitation of epichloae endophytes for agricultural benefit. *Fungal Diversity*, 60, 171-188.
- KIMMONS C.A., GWINN K.D. Y BERNARD E.C. (1990) Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease*, 74, 757-761.
- LANE G.A., CHRISTENSEN M.J. Y MILES C.O. (2000) Co-evolution of fungal endophytes with grasses: The significance of secondary metabolites. En: Bacon C.W.Y. y White, J.F. (Eds.) *Microbial Endophytes*. pp. 341-388. York, : Marcel Dekker.
- LEHTONEN P.T., HELANDER M., SIDDIQUI S.A., LEHTO K. Y SAIKKONEN K. (2006) Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*). *Biological Letters*, 2, 620-623.
- LEUCHTMANN A., BACON C., SCHARDL C., WHITE JR J.F. Y TADYCH M. (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106, 202-2015.
- LEYRONAS C. Y RAYNAL G. (2001) Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses. *Annals of Applied Biology*, 139, 119-127.
- MACIAS F.A., MOLINILLO J.M.G., VARELA R.M. Y GALINDO J.C.G. (2007) Allelopathy - a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63, 327-348.
- MALINOWSKI D.P., ALLOUSH G.A. Y BELESKY D.P. (1998a) Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant and Soil*, 205, 1-12.
- MALINOWSKI D.P., ALLOUSH G.A. Y BELESKY D.P. (2000) Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant and Soil*, 227, 115-126.
- MALINOWSKI D.P. Y BELESKY D.P. (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40, 923-940.
- MALINOWSKI D.P., BELESKY D.P., HILL N.S., BALIGAR V.C. Y FEDDERS J.M. (1998b) Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and Soil*, 198, 53-61.
- NAN Z.B. Y LI C.J. (2001) *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophytes/host interactions. En: Proceedings of the 4th International Neotyphodium/Grass interactions Symposium, pp 41-50. Soest, Alemania.
- NOVAS M.V., CABRAL D. Y GODEAS A.M. (2005) Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis*, 40, 23-30.
- OLIVEIRA J.A. (1996) Nuevas tendencias en la mejora de praderas: los endófitos. *Pastos*, 26, 3-22.
- OLIVEIRA J.A. Y CASTRO V. (1998) Incidence of *Neotyphodium* endophytes in Spanish perennial (*Lolium perenne* L.) ryegrass accessions. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 113, 1-3.
- OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E., COLLAR J. Y CASTRO P. (1997) Perennial ryegrass endophytes in Galicia, Northwest Spain. *Journal of Agricultural Science*, 129, 173-177.
- OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E. Y GONZALEZ E. (2003) Ergovaline concentration in perennial ryegrass infected with a lolitrem B-free fungal endophyte in north-west Spain. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 46, 117-122.
- OLIVEIRA J.A., ROTTINGHAUS G.E., PREGO C. Y GONZALEZ E. (2002) Contenido en alcaloides en semillas de poblaciones naturales de raigrás inglés del norte de España infectadas con los hongos endófitos *Neotyphodium*. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*, 17, 247-256.
- OLIVIER J.W. (2005) Pathophysiological response to endophyte toxins. En: Roberts C.A. et al. (Eds.) *Beotyphodium in Cool-Season Grasses*, pp 291-304. Iowa, EEUU: Blackwell Publishing.
- OMACINI M., CHANETON E.J., GHERSA C.M. Y OTERO P. (2004) Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos*, 104, 581-590.
- OMACINI M., EGGERS T., BONKOWSKI M., GANGE A.C. Y JONES T.H. (2006) Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology*, 20, 226-232.
- OMACINI M., SEMMARTIN M., PÉREZ L.I. Y GUNDEL P.E. (2012) Grass-endophyte symbiosis: A neglected above-ground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology*, 61, 273-279.
- PATERSON J., FORCHERIO C., LARSON B., SAMFORD M. Y KERLEY M. (1995) The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *Journal of Animal Science*, 73, 889-898.
- REED K.F.M., NIE Z.N., WALKER L.V., MACE W.J. Y CLARK S.G. (2011) Weather and pasture characteristics associated with outbreaks of perennial ryegrass toxicosis in southern Australia. *Animal Production Science*, 51, 738-752.
- REINHOLD-HUREK B. Y HUREK T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 435-443.
- RODRIGUEZ R.J., WHITE JR J.F., ARNOLD A.E. Y REDMAN R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182, 314-330.
- ROMO M., LEUCHTMANN A., GARCÍA B. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2007) A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Virus Research*, 124, 38-43.
- ROWAN D.D. Y GAYNOR D.L. (1986) Isolation of feeding deterrents against Argentine stem weevil from ryegrass

- infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *Journal of Chemical Ecology*, 12, 647-658.
- RYAN G. D., RASMUSSEN S., PARSONS A. J. Y NEWMAN J. A. (2015) The effects of carbohydrate supply and host genetic background on *Epichloë* endophyte and alkaloid concentrations in perennial ryegrass. *Fungal Ecology*, 18, 115-125.
- SÁNCHEZ MÁRQUEZ S.S., BILLS G.F., ACUÑA L.D. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2010) Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity*, 41, 115-123.
- SÁNCHEZ MÁRQUEZ S., BILLS G.F., HERRERO N. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2012) Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5, 289-297.
- SCHARDL C.L., FLOREA S., PAN J., NAGABHYRU P., BEC S. Y CALIE P.J. (2013a) The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 480-488.
- SCHARDL C.L., GROSSMAN R.B., NAGABHYRU P., FAULKNER J.R. Y MALLIK U.P. (2007) Loline alkaloids: Curricencies of mutualism. *Phytochemistry*, 68, 980-996.
- SCHARDL C.L., YOUNG C.A., HESSE U., AMYOTTE S.G., ANDREEVA K., CALIE P.J., FLEETWOOD D.J., HAWS D.C., MOORE N., OESER B., PANACCIONE D.G., SCHWERI K.K., VOISEY C.R., FARMAN M.L., JAROMCZYK J.W., ROE B.A., O'SULLIVAN D.M., SCOTT B., TUDZYNSKI P., AN Z., ARNAOUDOVA E.G., BULLOCK C.T., CHARLTON N.D., CHEN L., COX M., DINKINS R.D., FLOREA S., GLENN A.E., GORDON A., GÜLDENER U., HARRIS D.R., HOLLIN W., JAROMCZYK J., JOHNSON R.D., KHAN A.K., LEISTNER E., LEUCHTMANN A., LI C., LIU J.G., LIU J., LIU M., MACE W., MACHADO C., NAGABHYRU P., PAN J., SCHMID J., SUGAWARA K., STEINER U., TAKACH J.E., TANAKA E., WEBB J.S., WILSON E.V., WISEMAN J.L., YOSHIDA R. Y ZENG Z. (2013b) Plant-Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the Clavicipitaceae Reveals Dynamics of Alkaloid Loci. *PLoS Genetics*, 9.
- SCHARDL C.L., YOUNG C.A., MOORE N., KROM N., DUPONT P.-Y., PAN J., FLOREA S., WEBB J.S., JAROMCZYK J., JAROMCZYK J.W., COX M.P. Y FARMAN M.L. (2014) Genomes of Plant-Associated Clavicipitaceae. *Advances in Botanical Research*, 70, 291-327.
- SCHMIDT S.P. Y OSBORN T.G. (1993) Effects of endophyte-infected tall fescue on animal performance. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 44, 233-262.
- SIEGEL M.R. Y BUSH L.P. (1996) Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. *Recent Advances in Phytochemistry*, 30, 81-120.
- SOTO-BARAJAS M., ALVAREZ PASCUA A., ZABALGOGEAZCOA I. Y VÁZQUEZ-DE-ALDANA B.R. (2015) Efecto de la diversidad taxonómica de hongos endófitos *Epichloë* en la producción de alcaloides en *Lolium perenne*. En: Cifre J. et al. (Eds.) *Pastos y Forrajes en el siglo XXI*, pp 23-29. Palma de Mallorca, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- SOTO-BARAJAS M., VÁZQUEZ-DE-ALDANA B.R. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2014) Diversidad taxonómica de hongos endófitos *Epichloë/Neotyphodium* en *Lolium perenne* de distintos habitats. En: Busqué J. et al. (Eds.) *Pastos y PAC*, pp 193-200. Potes, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- TURNER B., CONKLIN F., CARROLL D., DELCURTO T. Y CROSS T. (1995) Feeding Oregon's grass straw to livestock: economic and nutritional considerations. Special Report 952. Pp 719-22. Agricultural Experimental Station Oregon State University, Oregon.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A., GARCÍA CRIADO B., VICENTE TAVERA S. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2013a) Fungal endophyte (*Epichloë festucae*) alters the nutrient content of *Festuca rubra* regardless of water availability. *PLoS ONE*, 8.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A., ZABALGOGEAZCOA I. Y GARCÍA CRIADO B. (2001) Ergovaline levels in cultivars of *Festuca arundinacea*. *Animal Feed Science and Technology*, 93, 169-176.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GUNDEL P.E., GARCÍA CRIADO B., GARCÍA CIUDAD A., GARCÍA SÁNCHEZ A. Y ZABALGOGEAZCOA I. (2014) Germination response of endophytic *Festuca rubra* seeds in the presence of arsenic. *Grass and Forage Science*, 69, 462-469.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ROMO M., GARCÍA-CIUDAD A., PETISCO C. Y GARCÍA-CRIADO B. (2011) Infection with the fungal endophyte *Epichloë festucae* may alter the allelopathic potential of red fescue. *Annals of Applied Biology*, 159, 281-290.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2003) Ergovaline occurrence in grasses infected by fungal endophytes of semi-arid pastures in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 347-353.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2007) Fungal alkaloids in populations of endophyte-infected *Festuca rubra* subsp *pruinosa*. *Grass and Forage Science*, 62, 364-371.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2013b) An *Epichloë* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. *Plant and Soil*, 362, 201-213.
- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., RUBIO DE CASAS R., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2010) Relationships between the genetic distance of *Epichloë festucae* isolates and the ergovaline and peramine contents of their *Festuca rubra* hosts. *Annals of Applied Biology*, 156, 51-61.
- WEST C.P., IZEKOR E., OOSTERHUIS D.M. Y ROBBINS R.T., 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant and Soil* 112, 3-6.

- WHITE J.F. Y BALDWIN N.A. (1992) A preliminary enumeration of grass endophytes in west central England. *Sydowia*, 44, 78-84.
- WHITE J.F. Y BULTMAN T.L. (1987) Endophyte-host associations in forage grasses. VIII. Heterothallism in *Epichloë typhina*. *American Journal of Botany*, 74, 1716-1721.
- WILKINSON H.H., SIEGEL M.R., BLANKENSHIP J.D., MALLORY A.C., BUSH L.P. Y SCHARDL C.L. (2000) Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 1027-1033.
- ZABALGOGÉAZCOA I. (2008) Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 138-146.
- ZABALGOGÉAZCOA I. Y BONY S. (2008) *Neotyphodium* research and application in Europe. En: Roberst *et al.* (Eds.) *Neotyphodium in Cool-Season Grasses*, pp 23-33. Iowa, EEUU: Blackwell Publishing.
- ZABALGOGÉAZCOA I., GARCÍA CIUDAD A., Y GARCÍA CRIADO B. (1998) *Neotyphodium coenophialum* en semillas de variedades forrajeras de *Festuca arundinacea*. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*, 13, 167-172.
- ZABALGOGÉAZCOA I., GARCÍA CIUDAD A., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R. Y GARCÍA CRIADO B. (2006a) Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra*. *European Journal of Agronomy*, 24, 374-384.
- ZABALGOGÉAZCOA I., ROMO M., KECK E., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A. Y GARCÍA CRIADO B. (2006b) The infection of *Festuca rubra* subsp *pruinosa* by *Epichloë festucae*. *Grass and Forage Science*, 61, 71-76.
- ZABALGOGÉAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A. Y GARCÍA CRIADO B. (1999) A survey of grass species infected by fungal endophytes in dehesa pastures. *Options Méditerranéennes*, 39, 247-250.
- ZABALGOGÉAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CIUDAD A. Y GARCÍA CRIADO B. (2003) Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Science*, 58, 94-97.

2

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS



TEMPORAL AND SPATIAL FLOWERING PATTERNS IN A SUPRAMEDITERRANEAN PASTURE-FOREST COMMUNITY IN THE IBERIAN CENTRAL SYSTEM (SPAIN)

Miguel Minaya Santa Cruz¹ and Consuelo Cebolla Lozano^{*2}

¹ Department of Molecular Microbiology and Immunology, Saint Louis University, 1100 South Grand, St. Louis, Missouri (USA) 63104.

² Departamento de Biología (Botánica), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Darwin, 2, 28049 Madrid (Spain).

PATRÓN DE FLORACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL EN UN PASTO SUPRAMEDITERRÁNEO DEL SISTEMA CENTRAL IBÉRICO (ESPAÑA) INFLUENCIADO DE FORMA HETEROGÉNEA POR LA COBERTURA FORESTAL

Historial del artículo:

Recibido: 15/12/15

Revisado: 11/02/16

Aceptado: 18/03/16

Disponible online: 20/04/16

* Autor para correspondencia:

consuelo.cebolla@uam.es

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Keywords:

Flowering phenology; flowering pulse; microenvironment; synchronous flowering; traditional human activities.

ABSTRACT

Species adjust their flowering throughout the annual cycle, showing both temporal and spatial patterns in the use of resources. Research examining temporal flowering dynamics and spatial flowering patterns within a Supramediterranean pasture is largely lacking, particularly within the Iberian Central System of Spain. Our aims were to establish an empirical flowering sequence throughout the annual cycle based on synchronously flowering species, and to investigate the relationship between local species flowering and environmental variables measured at different spatial points in a pasture-forest continuum.

Two types of sampling were conducted, once weekly throughout one annual cycle, for 133 previously selected herbaceous species. First, the presence of flowering species was monitored. The Jaccard similarity coefficient was used to group the sampling dates as a function of the synchronously flowering species observed at each sampling timepoint. Secondly, the presence of flowering species and the variables soil temperature and edaphic humidity percentage were monitored in nine permanent plots placed in areas influenced to different degrees by the woody canopy.

The temporal and spatial patterns inferred in this research contribute to explaining the singularity of the Supramediterranean pastures found in the Iberian Central System. The four flowering pulses assessed throughout the annual cycle allow us to make a first functional approximation to the natural rhythm of flowering that occurs in these communities. The spatial flowering pattern observed from February to July suggests the existence of a small-scale mosaic of microenvironments between the areas highly and scarcely affected by the forest canopy. This microenvironment segregation hypothesis would explain the synchrony of flowering of species with different environmental and chorological preferences. The temporal and the spatial flowering patterns postulated here would contribute to explaining the high richness of herbaceous species traditionally found in the few well-conserved Supramediterranean pasture – forest continuum ecosystems that still remain in the Iberian Central System of Spain.

Palabras clave:

Fenología de floración; pulso de floración; microambiente, floración sincrónica; actividades humanas tradicionales.

RESUMEN

En una comunidad vegetal las especies florecen progresivamente a lo largo del ciclo fenológico anual en función de la disponibilidad de recursos, generando patrones temporales y espaciales de floración. Hasta el momento son escasas las investigaciones que examinan estos procesos, particularmente en pastos supramediterráneos del Sistema Central Ibérico español. Nuestros objetivos fueron establecer la secuencia empírica de floración a partir del seguimiento de las especies que presentan floración sincrónica, e investigar, a escala local, la relación entre las especies en floración y las variables ambientales de humedad y temperatura edáficas.

Sobre un total de 133 especies herbáceas previamente seleccionadas, se llevaron a cabo dos tipos de muestreo con periodicidad semanal entre enero y diciembre. Primero, se siguió la presencia de floración en cada una de las especies seleccionadas. El coeficiente de similitud de Jaccard se aplicó para agrupar aquellas fechas de muestreo que presentaban un mayor número de especies con floración compartida. El segundo muestreo monitorizó la presencia de floración de cada una de las especies seleccionadas en nueve cuadros hijos de muestreo ubicados en áreas influenciadas de forma diferente por la cobertura arbórea.

Los patrones temporales y espaciales formulados en este trabajo ponen en valor la singularidad de los pastos supramediterráneos situados en el Sistema Central Ibérico. Los cuatro pulsos de floración descritos a lo largo del ciclo fenológico anual permiten hacer una primera aproximación funcional a los ritmos naturales de floración que caracterizan estas comunidades. Los patrones espaciales de floración detectados entre febrero y julio sugieren la emergencia en esos meses de un mosaico de microambientes entre las áreas altamente y escasamente afectadas por la cobertura forestal. Esta hipótesis expresa la sincronía de floración de especies herbáceas con preferencias ambientales y características corológicas diferentes, y contribuye a explicar la alta riqueza de especies propia de estos pastos supramediterráneos, algunos de los cuales aún hoy permanecen bien conservados en el Sistema Central Ibérico.

INTRODUCTION

Phenology is concerned with the timing of events. In plants, the timing of flowering is regulated by mechanisms which act to ensure that flower emergence occurs in suitable conditions (McClung, 2006; Tooke and Battey, 2010). Thus, flowering phenology is one of the most important characteristics in the life history of plants (Rathcke and Lacey, 1985; Doorn and Meeteren, 2003). The timing of flowering among species is of fundamental biological importance because it strongly affects the reproductive isolation or connectivity of a given species, potential pollinator attractions, out-crossing, speciation and hybridization (Primack, 1985; Rathcke and Lacey, 1985; Fenner, 1998; Inouye, 2008; Thomson, 2010). The factors that determine the evolution and maintenance of flowering phenologies are of fundamental interest for the understanding of species interactions and community function (Fenner, 1998). Species integrate a mosaic of temporal

and spatial patterns in the use of biotic and abiotic resources to flower (Kummerow *et al.*, 1981; Eviner and Chapin, 2003; or McClung, 2006; Giménez-Benavides *et al.*, 2007; Elzinga *et al.* 2007; Gea-Izquierdo *et al.*, 2009). Specifically, in temperate climates, the flowering process is attuned to the seasons through environmental cues, particularly humidity and temperature (Pausas and Carreras, 1995; Benito Alonso, 2005a, b).

The importance of environmental heterogeneity in influencing biodiversity is widely recognized in ecology (c.f. McIntosh, 1985; Rosenzweig, 1995; Huston, 1994, 1999; Stutzner and Moss, 2004; Sarr *et al.*, 2005; Costanza *et al.*, 2011). The so-called spatial heterogeneity hypothesis predicts that spatially varying environments promote biodiversity locally because heterogeneous environments allow more species to coexist locally than homogenous environments. Areas that include a greater range of microenvironments should contain more



Aspect of the mesophytic pasture studied throughout the annual cycle. A) First flowering pulse; B) Second flowering pulse; C) Third flowering pulse; D) Fourth flowering pulse.

Aspecto del pasto mesofítico estudiado a lo largo del ciclo anual. A) Primer pulso de floración; B) Segundo pulso de floración; C) Tercer pulso de floración; D) Cuarto pulso de floración.

species because more niche space is available for partitioning (e.g. Chesson, 2000; Pausas and Austin, 2001; Svenning, 2001; Snyder and Chesson, 2004; Frankl *et al.*, 2005). The configuration formed along the grassland-forest continuum is a remarkable example because these ecosystems embody two extremes of environmental gradients (Scholes and Archer, 1997) and represent a very rich ecosystem (Manning *et al.*, 2006; Peterson and Reich, 2008). Woody plants modify the environment below their canopies, e.g. by altering light, soil nutrients, soil temperature and water availability. The woody canopy allows for the flowering of a singular pool of herbaceous species adapted to these conditions (Manning *et al.*, 2006; Ovalle *et al.*, 2006). The intercanopy patches, on the other hand, do not have the interaction of the woody plants, and the group of species that is able to flower in these conditions is considerably different (Tongway *et al.*, 2001).

Predictions indicate great changes in climate over the next century, with more extreme temperatures and greater fluctuations in precipitation (IPCC, 2007), so it has become particularly important to understand more deeply the main climate-driven shifts in flowering phenology. Research forecasting flowering time (i.e. first dates, means and peaks) to predict the patterns of flowering phenology at the community level has received the most attention from community ecologists (e.g. Fitter and Fitter, 2002; Morales *et al.*, 2005; Cleland *et al.*, 2006; Giménez-Benavides *et al.*, 2007; Miller-Rushing and Primack, 2008; Miller-Rushing and Inouye, 2009; Craine *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2012; Satake *et al.*, 2013; Caradonna *et al.*, 2014). However, analyses of long-term data can mask substantial variation in phenological shifts through time (Iler *et al.*, 2013). Although the flowering phenology of the herbaceous communities of the Western Mediterranean basin has been the subject of a considerable number of studies (e.g. Arroyo, 1990; Guitián *et al.*, 1992; Ortega *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 1997; Tébar *et al.*, 2004), little is known about the variation in the direction and magnitude of phenological shifts in Supramediterranean natural pastures of Iberian mountains, which are representative communities of the Western Mediterranean (Redecker *et al.*, 2002) (see Materials and Methods for more details). Understanding the interplay of flowering phenology with environmental conditions over short periods of time and in small-scale ecological systems is fundamental to predicting the effects of climate change (Botkin *et al.*, 2007; IPCC, 2007) and the cessation of traditional human activities (c.f. Rivas-Martínez *et al.*, 1990; Fernández-González, 1991; Bartolomé *et al.*, 2005; San Miguel *et al.*, 2009).

In analyzing the temporal dynamic of flowering and spatial flowering patterns in a Supramediterranean pasture, we focus on two main hypotheses. First, if flowering throughout the annual cycle is influenced by the temporal dynamics of biotic and abiotic resources, then each species will have its own most favorable period of time for flowering. Thus, species with a temporal overlap in their flowering times (synchronous pattern

in their flowering) could be grouped based on their flowering period. Second, in a heterogeneous environment – such as a pasture-forest continuum –, species will have their own most favorable microenvironment in which to flower, generating a spatial flowering pattern. Using a weekly sampling scheme in a Supramediterranean pasture, the aims of our study were: (i) to explain the temporal flowering dynamics that occur throughout the annual cycle; (ii) to describe the spatial flowering pattern related to the small-scale environmental heterogeneity observed in a pasture-forest continuum.

MATERIALS AND METHODS

Study area

A representative pasture with a surface area of 80 m x 35 m (0.28 ha) was carefully selected in the upper Lozoya River Basin (Iberian Central System, Spain) at 1 120 m above sea level to carry out our analyses (Alameda del Valle, Madrid, Spain; 40°55'N; 3°50'W). The area has homogeneous clay-based soil with a pH of about 7.0, no slopes, and has had a similar type of extensive livestock exploitation for years. In bioclimatic terms the study area is Supramediterranean with semi-continental traits, and has an average annual precipitation of 790 mm (Rivas-Martínez *et al.*, 1990). The rainfall distribution is typically Mediterranean, with a characteristic two-month drought period during the summer. The study area is formed by a two-layered vegetation structure: open woodland that partially covers the study area (30-40% coverage), and an herbaceous community (>90%). The trees are mostly deciduous ashes and oaks (represented mainly by *Fraxinus angustifolia* and *Quercus pyrenaica*). The lower vegetation story is a mesophytic pasture, corresponding to the Alliance *Arrhenatherion elatioris* (San Miguel *et al.*, 2009). The herbaceous community is characteristically composed of species such as *Anthoxanthum odoratum*, *Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* and *Holcus lanatus*. The studied community presents a significant Eurosiberian component and the dominance of the hemicryptophytic biotype, which indicates its structural affinity with the northernmost pastures of the Iberian Peninsula and Europe. This resemblance is remarkable because these pastures are located in the Mediterranean region, where pastures of this type are scarce and highly dependent on the availability of water (Martínez-Sagarra *et al.*, 2013). Thus, these traditionally managed pastures, with an extremely species-rich herbaceous floristic composition have been catalogued in Annex I of the European Habitats Directive (Directive 92/43/EEC), which lists types of ecosystems that need to be protected to maintain a good state of preservation. Based on our previous observations (Minaya and Cebolla, 2009; Martínez-Sagarra *et al.*, 2013), a representation of 133 species (117 genera and 37 families) was selected a priori and monitored (Fig. S1) to test our hypotheses.

Experimental design and data analysis

Two types of sampling were conducted weekly in the studied community, for a total of forty-eight sampling dates from January to December of 2006. First, sampling was conducted over the entire study area, in order to monitor the presence/absence of flowering in the 133 herbaceous species, following the criteria of Peco *et al.* (1998) and Svenning (1999). The Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1912) was used to compare the presence of flowering species in the entire study area on each of the forty-eight sampling dates. The Jaccard coefficient grouped the sampling dates as a function of the synchronously flowering species observed at each timepoint. Flowering species are those that show individuals with open flowers, i.e. a flower in which stamens or stigmas can be seen without the observer pushing petals aside (Last, 2001). We consider that a group of species flowers synchronously when each species of the group presents specimens with open flowers at the same time. The dendrogram of similarities based on the Jaccard similarity coefficient allowed us to inquire into the temporal flowering dynamic of the plant community throughout the annual cycle.

The terminology *flowering pulse* is used in this research to designate discrete phases or expressions of flowering characterized by the synchrony of flowering of a group of species. The 133 selected species were classified into one of the main unambiguous (geophyte, hemicryptophyte or therophyte) biotype classifications proposed in Raunkiær's (1934) broadly used system. Their chorology was also assigned following the criteria of Tutin *et al.* (1980), Bolòs and Vigo (1990) and Castroviejo *et al.* (1986-2012). The proportion of biotypes and the chorologic representation (Mediterranean versus Eurosiberian species) was used to characterize each of the flowering pulses hypothesized from a morphofunctional and biogeographic point of view and to compare the flowering phenology of the study area with other Eurosiberian and Mediterranean communities.

A second sampling scheme was carried out weekly in the study community from January to December. This second

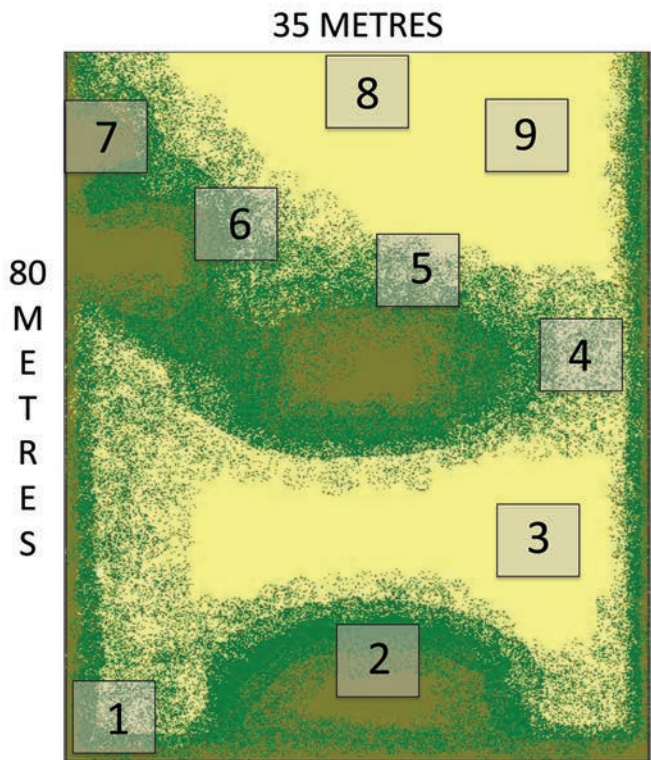
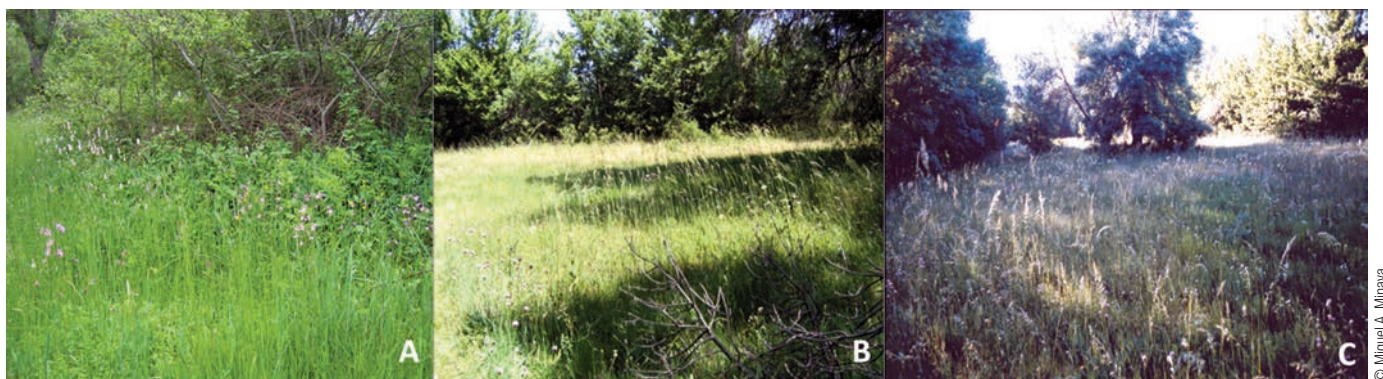


FIGURE 1. Simplified scheme of the study area. The dark green color indicates regions highly affected by the forest canopy, while the light green color indicates regions scarcely affected by the forest canopy. The dimensions of the study area, the number of the study plots (1 to 9) and their approximate locations in the study area are also represented. The selected regions were: a region highly affected (plots 1, 2 and 7); a region scarcely affected (3, 8 and 9); and an intermediate region (4, 5 and 6).

FIGURA 1. Esquema simplificado del área de estudio. Los tonos verdes oscuros indican regiones altamente afectadas por la cobertura forestal, los tonos verdes claros indican regiones escasamente afectados por la cobertura forestal. Queda representada las dimensiones del área del estudio, los cuadros de muestreo (del 1 al 9) y su localización aproximada en el área de estudio. Las regiones seleccionadas fueron: una región altamente afectada por las cobertura forestal (cuadros 1, 2 y 7); una región escasamente afectada (3, 8 y 9); una región intermedia (4, 5, y 6).



The three different areas analyzed in the study community. A) Area highly affected by the forest canopy; B) Intermediate; C) Scarcely.

Tres áreas analizadas en la comunidad estudiada. A) Áreas altamente afectadas por la cobertura forestal; B) Intermedias; C) Escasamente afectadas.

type of sampling was conducted in nine permanent study plots (0.5 x 0.5 m²) placed in three areas previously selected in the studied pasture. These three areas were (Figure 1): an area highly affected by the forest canopy (plots 1, 2 and 7); an area scarcely affected by the forest canopy (plots 3, 8 and 9); and an intermediate area (plots 4, 5 and 6). In these nine plots, we monitored the presence of flowering for each of the 133 species previously chosen, and the environmental variables soil temperature (T) and edaphic humidity percentage (EHP) during the early afternoon of each sample day (forty-eight days). The values for T were taken with a soil thermometer at a depth of 10 cm. Soil samples used to establish the EHP were collected simultaneously at the same points. The EHP was calculated by applying this formula: $EHP = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100$, where W_i is the initial weight of the soil sample, and W_f is the final weight of the soil sample after 72 hours in an oven at 35°C. The variables T and EHP were chosen because they have been directly associated with the first flowering date (Dunne *et al.*, 2003; Ausín *et al.*, 2005; Molau *et al.*, 2005; Kudo and Hirao, 2006; Michalski and Durka, 2007; Dunnell and Travers, 2011), and to correlate each microclimate with vegetation (Pausas and Carreras, 1995; Benito Alonso, 2005a, b).

To meet the assumptions of parametric statistical analyses, the variables T and EHP were transformed when necessary to achieve normality and variance homogeneity. Each variable was treated independently. In those cases where normality and variance homogeneity was not achieved after

transformation, the dates were subjected to non-parametric statistical tests. Parametric (ANOVA) and non-parametric (Kruskal-Wallis) statistical tests were used to analyze whether the means of the environmental variables (T and EHP) observed for the nine plots were statistically different. The relationship between the environmental variables and the presence of flowering species observed in each study plot was explored using Canonical Correspondence Analysis (CCA) (Leps and Smilauer, 2002). The statistical significance of the variables was evaluated using the Monte Carlo permutation test (1000 permutations). The null hypothesis was rejected if the P-value was less than or equal to 0.05.

RESULTS

Temporal flowering dynamic

The flowering pattern observed over the entire study area throughout the annual cycle was characterized by a high rate of change in the species that flowered at each sampling date and synchrony in flowering (Figures 2 and S1). This temporal dynamic leads to a repetitive process of increase and decrease in the number of flowering species. Thus, the Jaccard's test clustered the 44 sampling dates with flowering species into three main groups (Figure 3). Within the dendrogram of similarities, the third group (which clusters the sampling dates from August to December) shows two subgroups. Each subgroup represents a period of time with a

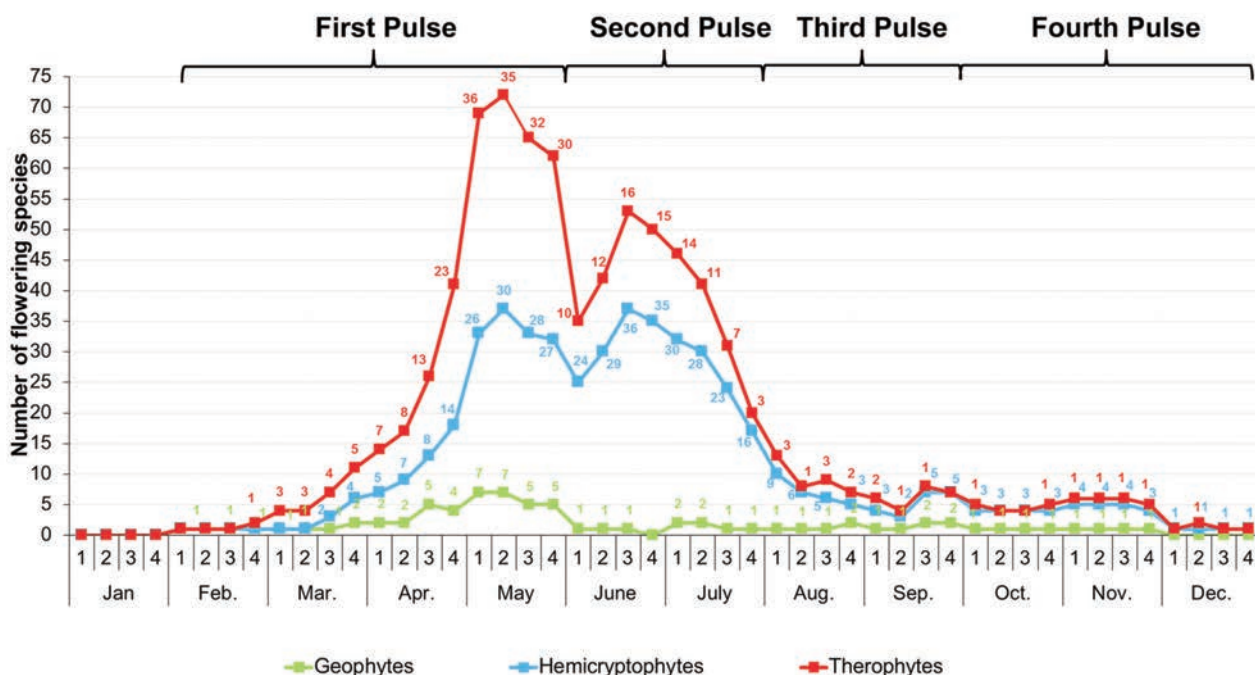


FIGURE 2. Flowering dynamics of therophytes, hemicryptophytes, and geophytes for each week throughout the annual cycle. The number of flowering species of each biotype, and the limits of each pulse are also indicated.

FIGURA 2. Dinámica de floración de terófitos, hemicriptófitos y geófitos en cada semana a lo largo del ciclo anual. Se incluye también el número de especies en floración para cada biotipo y los límites de cada pulso de floración.

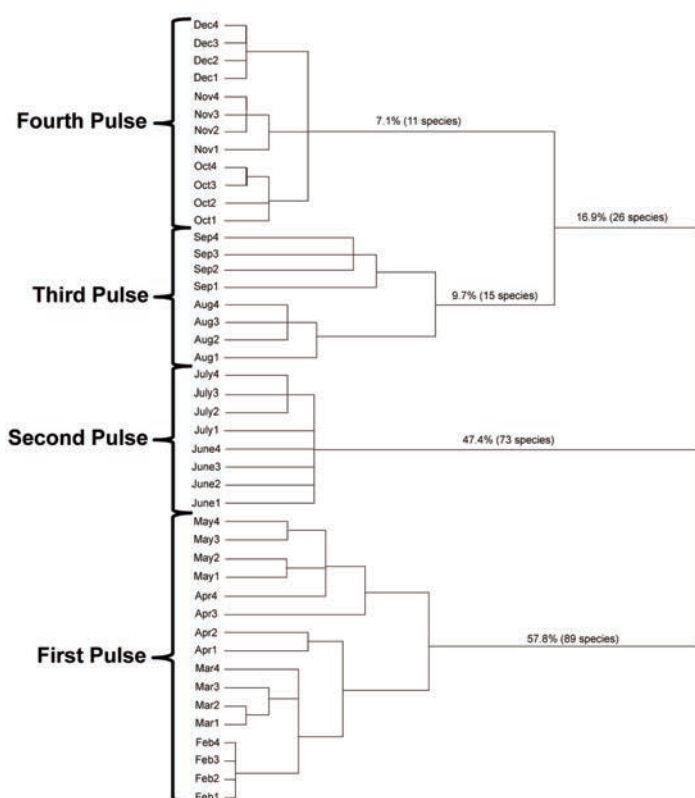


FIGURE 3. Representation of the four flowering pulses. This diagram is based on the similarity matrix obtained after calculating the Jaccard index on the 44 sampling dates with flowering species throughout the annual cycle (from February to December). The dendrogram illustrates the sampling dates clustered into four main groups, which represent the four flowering pulses. The percentage and number of species that flower in each pulse are indicated above the branches.

FIGURA 3. Representación de los cuatro pulsos de floración. El diagrama está basado en la matriz de similitud obtenida mediante el índice de Jaccard a partir de los 44 días de muestreo que presentaban floración a lo largo del ciclo anual (desde febrero a diciembre). El dendrograma ilustra la fecha de los días de muestreo agrupados en cuatro grupos principales, los cuales representan los cuatro pulsos de floración. El porcentaje y el número de especies que florecen en cada pulso están indicados sobre las ramas.

unique taxonomic composition (Figure S1: summertime versus autumnal flowering species) and different environmental conditions (Figures S2 and S3): warm and dry (August-September), versus cool and wet (October-December).

The dynamic observed throughout the annual cycle (Figures 2 and 3) suggests the existence of four flowering pulses. The first pulse (1st week of February – 4th week of May) presented 89 flowering species (66.9% of the species studied). Therophyte was the predominant biotype (43 species, e.g. *Bromus hordeaceus*, *Draba muralis*) and geophytes had their highest representation (9 species, e.g. *Hyacinthoides hispanica*, *Muscari comosum*). There was a similar number of species with Mediterranean distributions (18 species, e.g. *Aristolochia*

paucinervis) and Eurosiberian distributions (20 species, e.g. *Narcissus graellsii*, *Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum*). The second pulse (1st week of June – 4th week of July) showed 73 species flowering (54.8%). Hemicryptophyte was the most prevalent biotype (49 species; e.g. *Achillea millefolium*, *Campanula rapunculosa*). Therophytes were less abundant compared with the first pulse (21 species; e.g. *Conyza canadensis*, *Filago pyramidata*). Another significant feature which distinguished this second pulse from the previous one was the increase in species with Eurosiberian distributions (36 species, e.g. *Brachypodium sylvaticum*, *Holcus lanatus*) and the drop in species with Mediterranean distributions (10 species, e.g. *Petrorhagia nanteuilii*, *Serratula nudicaulis*). The third pulse (1st week of August – 4th week of September) had 15 flowering species (11.2%). Hemicryptophyte was the most prevalent biotype (10 species; e.g. *Centaureum erythraea*, *Centaurea ornata*). Species with Holartic distribution dominated (8 species, e.g. *Chondrilla juncea*, *Polygonum aviculare*), while the percentage of species with Eurosiberian distribution was lower than in the previous pulse (4 species, e.g. *Colchicum autumnale*, *Odontites vernus*). The fourth pulse (1st week of October – 4th week of December) presented 11 species flowering (8.2%). This pulse was characterized by the dominance of hemicryptophytes (8 species; e.g. *Chondrilla juncea*) and the presence of species that had flowered during the first and second pulses, then had stopped their flowering in the third pulse and finally presented a second flowering during the fourth pulse (e.g. *Bel-lis perennis*, *Conyza canadensis*, *Lactuca serriola*).

Spatial flowering pattern

The sampling of flowering species and the environmental variables (T and EHP) conducted in the nine permanent study plots placed in areas with varying degrees of influence of the forest canopy (Figure 1) showed the existence of three microenvironments in the first and second flowering pulses. The definition of these microenvironments was based on the differences of the means of T and EHP among the nine plots (Table 1; Figures S2 and S3) and the relationship between the environmental variables and the presence of flowering species (Figure 4).

Three microenvironments were distinguished in the first pulse (Table 1; Figures 4A, 5 and S3). A microenvironment with cooler and moister environmental values and a dominance of hemicryptophytes with Eurosiberian distribution was found in plot 1. Species such as *Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum*, *Luzula campestris*, *Potentilla neumanniana*, and *Ranunculus acris* flowered in this microenvironment. A microenvironment with warmer and dryer environmental values and dominance of therophytes with Mediterranean distribution was found in plots 3, 4, 8 and 9. The species that flowered in this microenvironment developed a dense and rich

First flowering pulse				Second flowering pulse				Third flowering pulse
CCA	Eigenvalue	F-ratio	P-value	CCA	Eigenvalue	F-ratio	P-value	Bonferroni correction performed on EHP and T:
First canonical axis	0.466	2.387	0.0070	First canonical axis	0.607	1.223	0.01	- Means of EHP and T are equal in plots 1 and 2
All canonical axes	0.625	1.853	0.0050	All canonical axes	0.602	1.264	0.071	- Means of EHP and T are equal in plots 3, 4, 8 and 9
Percentage of variance explained by:				Percentage of variance explained by:				- Means of T in plots 1 and 2 are different and lower than the means of plots 3, 4, 8 and 9
First two canonical axes	38.15%			First two canonical axes	29.62%			- Mean of EHP in plots 1 and 2 are different and higher than the means of plots 4, 8 and 9
Variable EHP	18.74%			Variable EHP	12.85%			
Variable T	17.45%			Variable T	14.78%			
Bonferroni correction performed on EHP:				ANOVA performed on EHP:				ANOVA performed on EHP:
- Mean of EHP in plot 1 is different and higher than plots 3, 4, 8 and 9				- Means of EHP are significantly equal in all plots				- Means of EHP are equal in all plots
- Mean of EHP is equal in plots 3, 4, 8, 9								
- Mean of EHP is equal in plots 2, 5, 6, 7								
Kruskal-Wallis test performed on T:				Bonferroni correction performed on T:				Kruskal-Wallis test performed on T:
- Means of T are equal in all plots				- Mean of T in plot 2 is different and lower than plots 1, 3-9				- Means of T are equal in all plots
				- Mean of T is equal in plots 1, 5, 6 and 7				
				- Mean of T is equal in plots 3, 4, 8 and 9				

TABLE 1. Synopsis of the statistical analyses performed in each flowering pulse. CCA: Canonical Correspondence Analyses; EHP: Edaphic Humidity Percentage; T: soil Temperature.

TABLA 1. Resumen de los análisis estadísticos llevados a cabo en cada pulso de floración. CCA: Análisis de Correspondencias Canónicas; EHP: Porcentaje de Humedad Edáfica; T: Temperatura edáfica.

pasture with species such as *Cerastium diffusum*, and *Erophila verna*. An intermediate microenvironment with transitional environmental values and a blend of biotypes and chorologies was found in plots 2, 5, 6, and 7. Mediterranean therophytes such as *Anthoxanthum aristatum* flowered alongside the Iberian endemic geophyte *Hyacinthoides hispanica*, the Atlantic geophyte *Narcissus graellsii*, and the Holarctic hemicryptophyte *Rumex acetosella* subsp. *angiocarpus*.

Three microenvironments were distinguished in the second pulse (Table 1; Figures 4B, 5 and S3). A microenvironment with cooler and moister environmental values and a dominance of hemicryptophytes with Eurosiberian distributions was found in plot 2. The presence of species with a limited distribution in the central Iberian Peninsula, such as the Eurosiberian *Dianthus armeria* and *Prunella laciniata* or the Mediterranean orophyte *Serratula nudicaulis* is remarkable in this microenvironment. A microenvironment with warmer and dryer environmental values and a similar share between therophytes and hemicryptophytes was found in plots 3, 4, 8, and 9. Species such as *Filipendula vulgaris*, *Hypericum perforatum* and *Verbascum pulverulentum* flowered in this microenvironment. An intermediate microenvironment with transitional environmental values and the remarkable presence of species with Holarctic distribution such as *Vicia lathyroides* was found in plots 1, 5, 6 and 7.

The Bonferroni correction revealed differences of EHP and T between different plots in the third pulse. The ANOVA performed on EHP and the Kruskal-Wallis test performed on T confirmed the homogeneity of temperature and humidity in the study area in the fourth pulse (Table 1; Figures 5 and S3). However, according to the criteria previously established, the absence of flowering species in the study plots from August to December meant that we could not categorize the existence of microenvironments during the third and fourth pulses.

DISCUSSION

Climate shapes the flowering patterns of the herbaceous community studied both by setting the seasonal bounds for flowering and by shifting stressors during the growing season. Low temperatures that define the start and end of the growing season place fundamental limits on the period of plant flowering in many temperate systems (Larcher, 2003; Schwartz, 2003; Inouye, 2008). The four flowering pulses hypothesized in this research (Figures 2 and 3) allow us to make a first functional approximation to the natural rhythm of flowering that occurs in a Supramediterranean pasture throughout the annual cycle. Differentiation of species in their flowering times has been seen as an advantage for “exploitation” of temporal space (Martínková *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2006; Inouye, 2008; Pau *et al.*, 2011), so the high interspecific flowering overlap described during the first and second pulses might be a strategy related to the optimal use of resources in a limited period of time, as previously hypothesized by authors such as Pojar (1974), Arroyo (1988) or Michalski and Durka (2007).

The herbaceous community studied here presents a temporal flowering dynamic that is a combination of those typically described for Mediterranean (e.g. Petanidou *et al.*, 1995; Bosch *et al.*, 1997; Thompson, 2005) and Eurosiberian grassland communities (e.g. Warren and Billington, 2005). The chorology of species dominant in the first and second pulses moves northward: during the first pulse we found a majority of flowering species with Mediterranean distributions, and during the second pulse a preponderance of Eurosiberian flowering species was found. Similarly, the biotype of the dominant species throughout the annual cycle transfers from the ephemeral therophytes to the longer-lived hemicryptophyte species. The Mediterranean aspect of the studied community is represented by the presence of flowering species

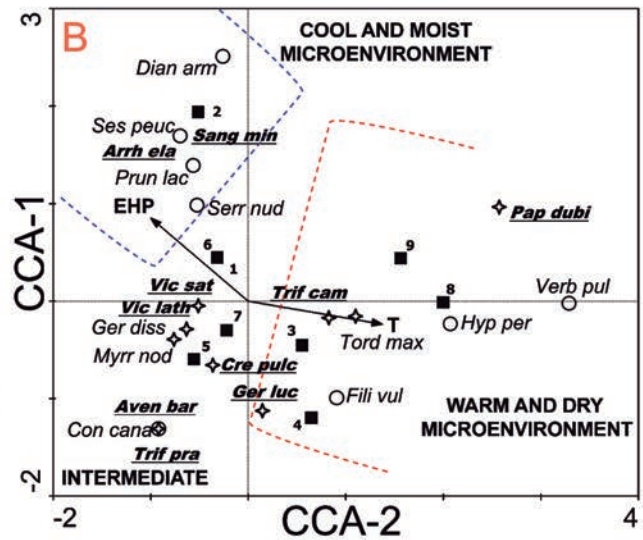
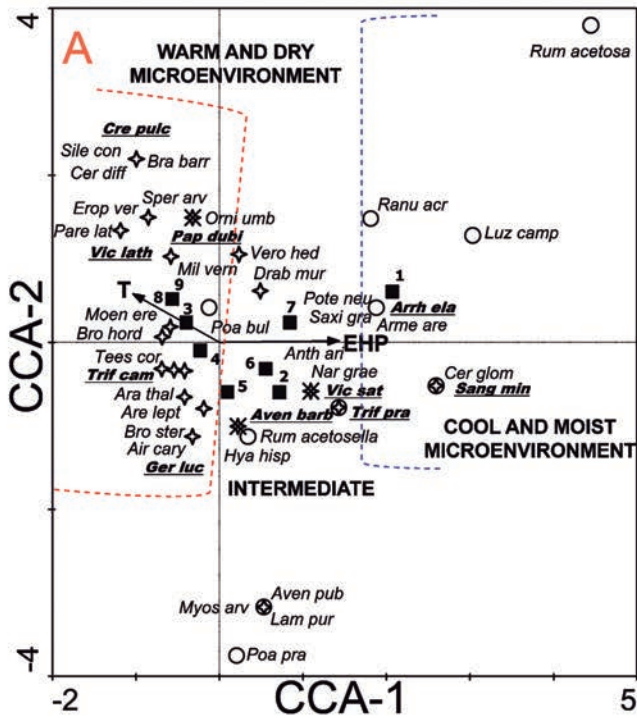


FIGURE 4. Canonical correspondence analysis ordination triplot of the environmental variables soil temperature (T) and edaphic humidity percentage (EHP), study plots (1 – 9) (■), and flowering species observed in the nine study plots. A) First flowering pulse. B) Second flowering pulse. Geophyte (×), hemicryptophyte (○), and therophyte (+). Bold underlined species are found in the first and the second pulse. The species abbreviations are decoded in brackets in figure S1. Dotted lines represent the approximate limit of the warm and dry microenvironment (red dotted line) and the cool and moist microenvironment (blue dotted line).

FIGURA 4. Análisis de correspondencia canónica ordenando las variables ambientales temperatura edáfica (T) y porcentaje de humedad edáfica (EHP), los cuadros de muestreo (1 – 9) (■), y las especies en floración observadas en los nueve cuadros de muestreo. A) Primer pulso de floración. B) Segundo pulso de floración. Geófitos (×), hemicriptófitos (○) y terófitos (+). Las especies subrayadas y en negrita fueron encontradas floreciendo durante el primer y el segundo pulso. La abreviación de las especies esta decodificado entre paréntesis en la figura S1. Las líneas discontinuas representan los límites aproximados del microambiente cálido y seco (línea discontinua roja) y el microambiente frío y húmedo (línea discontinua azul).

with Mediterranean chorology (52.64% of species sampled), the beginning of flowering in February with a maximum peak between April and May, and the autumnal flowering patterns previously described by authors such as Tébar *et al.* (2004) in Mediterranean communities. Furthermore, some of the autumnal flowering species described in this research presented summer dormancy (Figure S1), a strategy which also characterizes the Mediterranean herbaceous communities as a response to the lack of adequate resources during the summer (Debussche *et al.*, 2004; Tébar *et al.*, 2004; Sherry *et al.*, 2007). The Eurosiberian aspect is characterized by the presence of species with Eurosiberian chorology (47.36%) and the existence of a secondary peak of flowering between June and July (Figure 2), a date which is similar to the one established for Eurosiberian grassland communities (e.g. Guitián *et al.*, 1989; Martinková *et al.*, 2002; Warren and Billington, 2005). The combination of the Mediterranean and Eurosiberian flowering dynamic hypothesized in this research would be explained by the reproductive strategy of Supramediterranean communities to take advantage of their changing environmental conditions (c.f. Rivas-Martinez *et al.*, 1990; San Miguel *et al.*, 2009).

Local species richness is based on different ecological processes acting at different scales (Shmida and Wilson, 1985; Levin, 2000; Costanza *et al.*, 2011). We investigated the relationship between local species flowering and environmental variables measured at different spatial points in order to better understand these processes. The spatial flowering pattern described from February to July in the pasture-forest continuum (Figures 4 and 5) suggests the existence of a small-scale mosaic of microenvironments between the areas highly and scarcely affected by the forest canopy. This microenvironment segregation hypothesis would explain the synchrony of flowering of species with different environmental preferences and chorologies. The detection of the intermediate microenvironment, characterized by transitional values of temperature and humidity (Figure 4), constitutes the best indicator of the marked mesophytic tendency of the plant community in this pasture. Its ecotonic properties give it a function as a reservoir of species, and its fluctuating expression gives it the ability to modulate the flowering behavior of the pasture depending on the climate conditions that occur. The few studies that have focused on ecotonic areas have suggested that the variance of the environmental variables (e.g. temperature and humidity) is

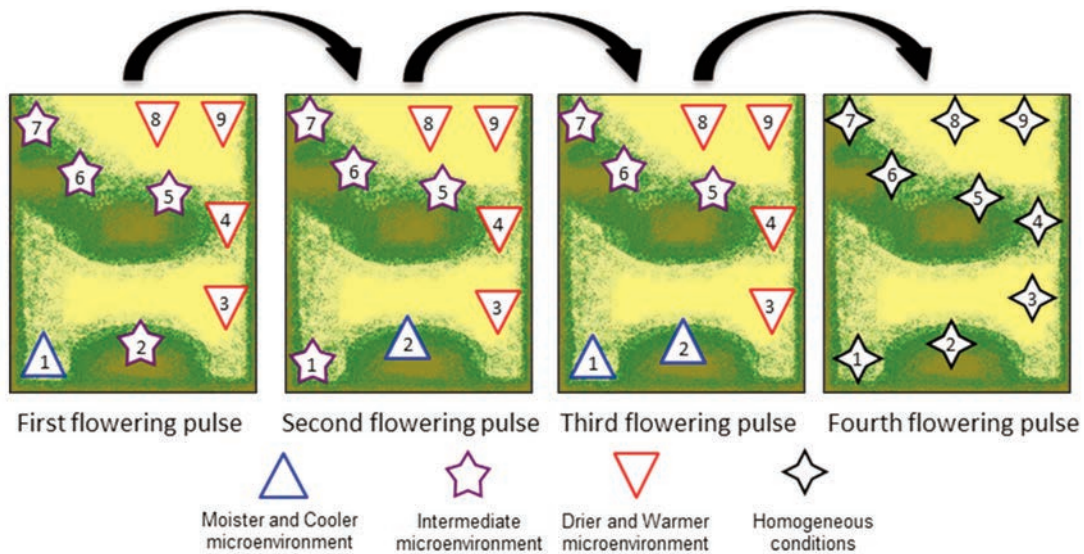


FIGURE 5. Evolution of the environmental conditions observed in each of the nine study plots throughout the annual cycle.

likely to be greatest at an intermediate level of woody plant coverage (Breshears, 2006). Thus, we might expect ecosystem properties for areas with an intermediate proportion of coverage to be among the most sensitive to changes in the grassland-forest continuum.

CONCLUSION

The temporal and spatial use of resources assessed in this research throughout the annual cycle demonstrates the complex ecological organization of a representative Supramediterranean pasture located in the Iberian Central System (Spain), and corroborates previous propositions related to the organization of plant species at small scales in heterogeneous environments (Mauchamp *et al.*, 1994; De Miguel *et al.*, 2005; Dufour *et al.*, 2006; Lundholm, 2009). We suggest a model of four flowering pulses to describe the temporal flowering dynamic of the studied community and describe three microenvironments based on the presence of flowering species and the variables soil temperature and edaphic humidity percentage: (i) a cool and moist microenvironment with a Eurosiberian character; (ii) a warm and dry microenvironment with a Mediterranean character; and (iii) an intermediate microenvironment. The presence of scattered trees produces a small-scale mosaic of microenvironments that changes spatially and temporally throughout the annual cycle. This heterogeneity creates niche diversity, which allows for the coexistence of diverse species, and contributes to explaining the high species richness traditionally described in these communities (Bartolomé *et al.*, 2005; San Miguel *et al.*, 2009; Martínez-Sagarra *et al.*, 2013).

Although the experimental design limited our findings to one growing season, and further studies comprising more years

FIGURA 5. Evolución de las condiciones ambientales observadas en cada uno de los nueve cuadros de muestreo a lo largo del ciclo anual.

and measurements are required, our results provide a baseline for comparison with other similar communities. This study also suggests that scientists, land managers, and policy makers could gain useful insights by focusing on the effects of woody plants on the flowering of the lower herbaceous stories. It is our hope that our results can encourage vegetation scientists to tackle the difficult problem of quantifying floral resources at the landscape scale. Any approach that helps to evaluate the natural rhythms of flowering throughout an annual cycle might help us to understand important issues such as the pollinator dynamic and the effects of global warming on flowering patterns.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M.A. Casado and J.G. Segarra for their comments on and corrections of the manuscript. We also appreciate the critiques, comments and suggestions of L. Giménez and an anonymous reviewer. We would also like to thank E. Lemonds for her linguistic assistance. The first author would like to thank P. Pavón and M.A. Rivas-Ponce for their invaluable help with fieldwork and plant identification.

REFERENCES

- ARROYO J. (1988) Atributos florales y fenología de la floración en matorrales del Sur de España. *Lagascalia*, 15, 43-78.
- ARROYO J. (1990) Spatial variation of flowering phenology in the Mediterranean shrublands of southern Spain. *Israel Journal of Botany*, 39, 249-262.
- AUSÍN I., ALONSO-BLANCO C. AND MARTÍNEZ-ZAPATER M. (2005) Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology*, 49, 689-705.

- BARTOLOMÉ C., ÁLVAREZ J., VAQUERO J., COSTA M., CASERMEIRO M.A., GIRALDO J. AND ZAMORA J. (2005) *Los tipos de Hábitat de Interés Comunitario en España. Guía Básica*. Ministerio de Medio Ambiente. Dirección General para la Diversidad. Madrid. Spain.
- BENITO ALONSO J.L. (2005a) *Flora y vegetación del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido*. Universidad de Barcelona.
- BENITO ALONSO J.L. (2005b) Influencia de la inversión térmica en la flora y vegetación del valle de Ordesa (Pirineo Central) España, 141, 63-68.
- BOLÒS O. AND VIGO J. (1990) *Flora dels Països Catalans*. Barcelona, Spain, Barcino.
- BOSCH J., RETANA J. AND CERDÁ X. (1997) Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous Mediterranean plant community. *Oecologia*, 109, 583-591.
- BOTKIN D.B., SAXE H., ARAÚJO M.B., BETTS R., BRADSHAW R.H.W., CEDHAGEN T., CHESSON P., DAWSON T.P., ETTERTON J.R., FAITH D.P., FERRIER S., GUI SAN A., HANSEN A.S., HILBERT D.W., LOEHLE C., MARGULES C., NEW M., SOBEL M.J. AND STOCKWELL D.R.B. (2007) Forecasting the effects of Global Warming on Biodiversity. *BioScience*, 57, 227-236.
- BRESHEARS D.D. (2006) The grassland-forest continuum: trends in ecosystem properties for woody plant mosaics? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4, 96-104.
- CARADONNA P.J., ILER A.M. AND INOUE D.W. (2014) Shifts in flowering phenology reshape a subalpine plant community. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111, 4916-4921.
- CASTROVIEJO, S., LAÍN Z, M., LÓPEZ GONZÁLEZ, G., MONTERRAT, P., MUÑOZ GARMENDIA, F., PAIVA, J. AND VILLAR, L., (eds) (1986-2012). *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- CHESSON P. (2000) General theory of competitive coexistence in spatially-varying environments. *Theoretical Population Biology*, 58, 519-553.
- CLELAND E.E., CHIARIELLO N.R., LOARIE S.R., MOONEY H.A., AND FIELD C.B. (2006). Diverse responses of phenology to global changes in a grassland ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13740-13744.
- COOK B.I., WOLKOVICH E.M. AND PARMESAN C. (2012) Divergent responses to spring and winter warming drive community level flowering trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 9000-9005.
- COSTANZA J.K., MOODY A. AND PEET R.K. (2011) Multi-scale environmental heterogeneity as a predictor of plant species richness. *Landscape Ecology*, 26, 851-864.
- CRAINE J.M., WOLKOVICH E.M., TOWNE E.G. AND KEMBEL S.W. (2012) Flowering phenology as a functional trait in a tallgrass prairie. *New Phytologist*, 193, 673-682.
- DEBUSSCHE M., GARNIER E. AND THOMPSON J.D. (2004) Exploring the causes of variation in phenology and morphology in Mediterranean geophytes: a genus-wide study of *Cyclamen*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145, 469-484.
- DE MIGUEL J.M., RAMÍREZ-SANZ L., CASTRO I., COSTA-TENORIO M., CASADO M.A. AND PINEDA F.D. (2005) Plant species richness and spatial organization at different small scales in western Mediterranean landscapes. *Plant Ecology*, 176, 185-194.
- DOORN W.G. AND MEETEREN U. (2003) Flower opening and closure: a review. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1801-1812.
- DUFOUR A., GADALLAH F., WAGNER H.H., GUI SAN A. AND BUTTLER A. (2006) Plant species richness and environmental heterogeneity in a mountain landscape: effects of variability and spatial configuration. *Ecography*, 29, 573-584.
- DUNNE J.A., HARTE J. AND TAYLOR K.J. (2003) Subalpine meadow flowering phenology responses to climate change: integrating experimental and gradient methods. *Ecological Monographs*, 73, 69-86.
- DUNNELL K.L. AND TRAVERS S.E. (2011) Shifts in the flowering phenology of the northern great plains: patterns over 100 years. *American Journal of Botany*, 98, 935-945.
- ELZINGA J.A., ATLAN A., BIERE A., GIGORD L., WEIS A.E. AND BERNASCONI G. (2007) Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(8), 432-439.
- EVINER V.T. AND CHAPIN F.S. (2003) Functional matrix: a conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 455-485.
- FENNER M. (1998). The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1, 78-91.
- FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ F. (1991) La vegetación del Valle del Paular (Sierra de Guadarrama, Madrid). *Lazaroa*, 12, 153-272.
- FITTER A.H. AND FITTER R.S.R. (2002) Rapid changes in flowering time in British plants. *Science*, 296, 1689-1691.
- FRANKL R., WANNING S. AND BRAUN R. (2005) Quantitative floral phenology at the landscape scale: Is a comparative spatio-temporal description of "flowering landscapes" possible? *Journal of Nature Conservation*, 13, 219-229.
- GEA-IZQUIERDO G., MONTERO G. AND CAÑELLAS I. (2009) Changes in limiting resources determine spatio-temporal variability in tree-grass interactions. *Agroforestry Systems*, 76, 375-387.
- GIMÉNEZ-BENAVIDES L., ESCUDERO A. AND IRIONDO J.M. (2007) Reproductive limits of a late-flowering high-mountain Mediterranean plant along an elevational climate gradient. *New Phytologist*, 173, 367-382.
- GUITIÁN J., OUBIÑA J.R. AND SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ J.M. (1989) Fenología de la floración en brañas del noroeste de la Península Ibérica. *Anales Jardín. Bot. Madrid*, 47, 401-409.

- GUITIÁN J., SÁNCHEZ J.M. AND RODRÍGUEZ-GUITIÁN M. (1992) Fenología de la floración en un área mediterránea del noroeste ibérico: contrastes con áreas eurosiberianas próximas. *Lazaroa*, 13, 111-119.
- HUSTON M.A. (1994) *Biological diversity. The coexistence of species on changing landscapes*. Cambridge University Press.
- HUSTON M.A. (1999) Local processes and regional patterns: appropriate scales for understanding variation in the diversity of plants and animals. *Oikos*, 86, 393-401.
- ILER A.M., HOYE T.T., INOUE D.W. AND SCHMIDT N.M. (2013) Long-Term trends mask variation in the direction and magnitude of short-term phenological shifts. *American Journal of Botany*, 100, 1398-1406.
- INOUE D.W. (2008) Effects of climate change on phenology, frost damage, and floral abundance of montane wildflowers. *Ecology*, 89, 353-362.
- IPCC [Intergovernmental Panel on Climate Change] (2007) *Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. New York, USA: Cambridge University Press,
- JACCARD P. (1912) The distribution of the flora of the alpine zone. *New Phytologist*, 11, 37-50.
- KUDO G. AND HIRAO A.S. (2006) Habitat-specific responses in the flowering phenology and seed set of alpine plants to climate variation: implications for global-change impacts. *Population Ecology*, 48, 49-58.
- KUMMEROW J., MONTENEGRO G. AND KRAUSE A. (1981) Biomass, phenology and growth. In: Muller P.C. (Ed.), *Resource use by chaparral and matorral*. pp. 69-96. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- LARCHER W. (2003) *Physiological plant ecology*. Berlin, Germany: Springer.
- LAST F. (2001) Keeping records. *The Horticulturist*, 10, 9-11.
- LEPS J. AND SMILAUER, P. (2002) *Multivariate Analysis of Ecological data using CANOCO*. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia. Ceske Budejovice.
- LEVIN S.A. (2000) Multiple scales and the maintenance of biodiversity. *Ecosystems*, 3, 498-506.
- LUNDHOLM J.T. (2009) Plant species diversity and environmental heterogeneity: spatial scale and competing hypotheses. *Journal of Vegetation Science*, 20, 277-391.
- MANNING A.D., FISCHER J. AND LINDENMAYER D.B. (2006) Scattered trees are keystone structures – Implications for conservation. *Biological Conservation*, 132, 311-321.
- MARTÍNEZ-SAGARRA G., MINAYA M.A., ALONSO P., CARRARÓS R., LUCÍA V., ORGAZ D. AND CEBOLLA C. (2013) Datos sobre los pastos en el fondo del valle de El Paular (Sierra de Guadarrama, Comunidad de Madrid): Manteniendo riqueza florística y uso tradicional. In: Márquez de Prado L., Poblaciones M.J., Rodrigo S.M., Santamaría Becerril O. (eds). *Los Pastos: Nuevos Retos, Nuevas Oportunidades*. 52 Congreso Nacional Sociedad Española Estudio de Pastos (SEEP). pp. 49-56. Badajoz, Spain.
- MARTÍNKOVÁ J., SMILAUER P. AND MIHULKA S. (2002) Phenological pattern of grassland species: relation to the ecological and morphological traits. *Flora*, 197, 290-302.
- MAUCHAMP A.S., RAMBAL S. AND LEPART J. (1994) Simulating the dynamics of a vegetation mosaic: a spatialized functional model. *Ecological Modelling*, 71, 107-130.
- MCCLUNG C.R. (2006) Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 18, 792-803
- MCINTOSH R.P. (1985) *The background of ecology: concept and theory*. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press.
- MICHALSKI S.G. AND DURKA W. (2007) Synchronous pulsed flowering: analysis of the flowering phenology in *Juncus* (Juncaceae). *Annals of Botany*, 100, 1271-1285.
- MILLER-RUSHING A.J. AND INOUE D.W. (2009) Variation in the impact of climate change on flowering phenology and abundance: An examination of two pairs of closely related wildflower species. *American Journal of Botany*, 96, 1821-1829.
- MILLER-RUSHING A.J. AND PRIMACK R.B. (2008) Global warming and flowering times in Thoreau's Concord: A community perspective. *Ecology*, 89, 332-341.
- MINAYA, M.A. AND CEBOLLA, C. (2009) Análisis preliminar de los patrones fenológicos en un prado mesohigrófilo guadarrámico. In: Reiné R., Barrantes, O., Broca, A. and Ferrer C. (eds.) *La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas*. 48 Congreso Nacional Sociedad Española Estudio de Pastos (SEEP). pp 117-123. Huesca, Spain.
- MOLAU U., NORDENHÄLL U. AND ERIKSEN B. (2005) Onset of flowering and climate variability in an alpine landscape: a 10-years study from Swedish Lapland. *American Journal of Botany*, 92, 422-431.
- MORALES M.A., DODGE G.J. AND INOUE D.W. (2005) A phenological mid-domain effect in flowering diversity. *Oecologia*, 142, 83-89.
- ORTEGA M., LEVASSOR C., CASADO M.A. AND PECO B. (1993) Phenological organization of Mediterranean pastures in different environments studied through diversity parameters. *Anales de Biología*, 19, 105-120.
- OVALLE C., DEL POZO A., CASADO M.A., ACOSTA B. AND DE MIGUEL J.M. (2006) Consequences of landscape heterogeneity on grassland diversity and productivity in the espinal agroforestry system of central Chile. *Landscape Ecology*, 21, 585-594.
- PAU S., WOLKOVICH E.M., COOK B.I., DAVIES T.J., KRAFT N.J.B., BOLMGREN K., BETANCOURT J.L. AND CLELAND E.E. (2011) Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. *Global Change Biology*, 17, 3633-3643.
- PAUSAS J.G. AND AUSTIN M.P. (2001) Patterns of plant species richness in relation to different environments: an appraisal. *Journal of Vegetation Science*, 12, 153-166.
- PAUSAS J.G. AND CARRERAS J. (1995) The effect of bedrock type, temperature and moisture on species richness of Pyrenean Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forests. *Vegetatio*, 116, 85-92.

- PECO B., ESPIGARES T. AND LEVASSOR C. (1998) Trends and fluctuations in species abundance and richness in Mediterranean annual pastures. *Applied Vegetation Science*, 1, 21-28.
- PETANIDOU T., ELLIS W.N., MARGARIS N.S. AND VOKOU D. (1995) Constraints of flowering phenology in a phryganic (East Mediterranean shrub) community. *American Journal of Botany*, 82, 607-620.
- PETERSON D.W. AND REICH P.B. (2008) Fire frequency and tree canopy structure influence plant species diversity in a forest-grassland ecotone. *Plant Ecology*, 194, 5-16.
- POJAR J. (1974) Reproductive dynamics of four plant communities of southwestern British Columbia. *Canadian Journal of Botany*, 52, 1819-1834.
- PRIMACK R.B. (1985) Patterns of flowering phenology on communities, populations, individuals, and single flowers. In: White J. (ed) *The populations structure of vegetation.*, pp. 571-593. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers.
- RATHCKE B. AND LACEY E.P. (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 179-214.
- RAUNKIÆR C. (1934) *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography, being the collected papers of C. Raunkiær.* Oxford, UK: Oxford University Press.
- REDECKER B., FINCK P., HÄRDITL W., RIECKEN U. AND SCHRÖDER E. (eds) (2002) *Pasture landscapes and nature conservation.* Berlin; Heidelberg; New York: Springer
- RIVAS-MARTÍNEZ S., FERNÁNDEZ GONZÁLEZ F., SÁNCHEZ MATA D. AND PIZARRO J.M. (1990) La Vegetación de la Sierra de Guadarrama. *Itínera Geobotánica*, 4, 3-132.
- ROSENZWEIG M.L. (1995) *Species diversity in space and time.* Cambridge University Press.
- SAN MIGUEL A., ROIG GÓMEZ S., ALZUETA LUSARRETA C., CAÑEQUE MARTÍNEZ V., ORTUÑO PÉREZ S., CAÑELLAS I., MALO ARRÁZOLA J., MARTÍNEZ MARTÍNEZ T., RODRÍGUEZ ROJO M^a.P., MONLEÓN GARCÍA J.L., SÁNCHEZ MATA D., BARBEITO SÁNCHEZ I., GEA-IZQUIERDO G., ÁLVAREZ ACERO I., MARTÍNEZ JÁUREGUI M. AND MUÑOZ IGUALADA J. (2009) *Los Pastos de la Comunidad de Madrid. Tipología, Cartografía y Evaluación.* Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio. Serie Técnica del Medio Natural, Nº 4.
- SATAKE A., KAWAGOE T., SABURI Y., CHIBA Y., SAKURAI G. AND KUDOH H. (2013) Forecasting flowering phenology under climate warming by modelling the regulatory dynamics of flowering-time genes. *Nature Communications*, 4, Doi: 10.1038/ncomms3303
- SARR D.A., HIBBS D.E. AND HUSTON M.A. (2005) A hierarchical perspective of plant diversity. *The Quarterly Review of Biology*, 80, 187-212.
- SCHOLES R.J. AND ARCHER S.R. (1997) Tree-grass interactions in savannas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 517-544.
- SCHWARTZ M.D. (2003) *Phenology: an integrative environmental science.* Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic.
- SCHWARTZ M.D., AHAS R. AND AASA A. (2006) Onset of spring starting earlier across the Northern Hemisphere. *Global Change Biology*, 12, 343-351.
- SHERRY R.A., ZHOU X., GU S., ARNONE J.A., SCHIMEL D.S., VERBURG P.S., WALLACE L.L. AND LUO Y. (2007) Divergence of reproductive phenology under climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 198-202.
- SHMIDA A. AND WILSON M. (1985) Biological determinants of species diversity. *Journal of Biogeography*, 12, 1-20.
- SNYDER R.E. AND CHESSON P. (2004) How the spatial scales of dispersal, competition and environmental heterogeneity interact to affect coexistence. *American Naturalist*, 164, 633-650.
- STATZNER B. AND MOSS B. (2004). Linking ecological function, biodiversity and habitat: a mini-review focusing on older ecological literature. *Basic and Applied Ecology*, 5, 97-106.
- SVENNING J.C. (1999) Microhabitat specialization in a species-rich palm community in Amazonian Ecuador. *Journal of Ecology*, 87, 55-65.
- SVENNING J.C. (2001) On the role of microenvironmental heterogeneity in the ecology and diversification of neotropical rain-forest palms (Arecaceae). *The Botanical Review*, 67, 1-53.
- TÉBAR F.J., GIL L., AND LLORENS L. (2004) Flowering and fruiting phenology of a xerochamaephytic shrub community from the mountain of Mallorca (Balearic islands, Spain). *Plant Ecology*, 174, 293-303.
- THOMPSON J.D. (2005) *Plant Evolution in the Mediterranean.* Oxford, UK: Oxford University Press.
- THOMSON J.D. (2010) Flowering phenology, fruiting success and progressive deterioration of pollination in an early-flowering geophyte. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B, Biological Sciences*, 365, 3187-3199.
- TONGWAY D.J., VALENTIN C., AND SEGHERI J. (2001) *Banded vegetation patterning in arid and semiarid environments. Ecological processes and consequences for management.* New York, USA: Ecological Studies.
- TOOKE F. AND BATTEY N.H. (2010) Temperate flowering phenology. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2853-2862.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., AND WEBB D.A. (eds), (1980). *Flora Europaea.* Cambridge, UK: Cambridge University Press,
- WARREN J., AND BILLINGTON T. (2005) Flower colour phenology in British mesotrophic grassland communities. *Grass and Forage Science*, 60, 332-336.

SUPPLEMENTARY FIGURES

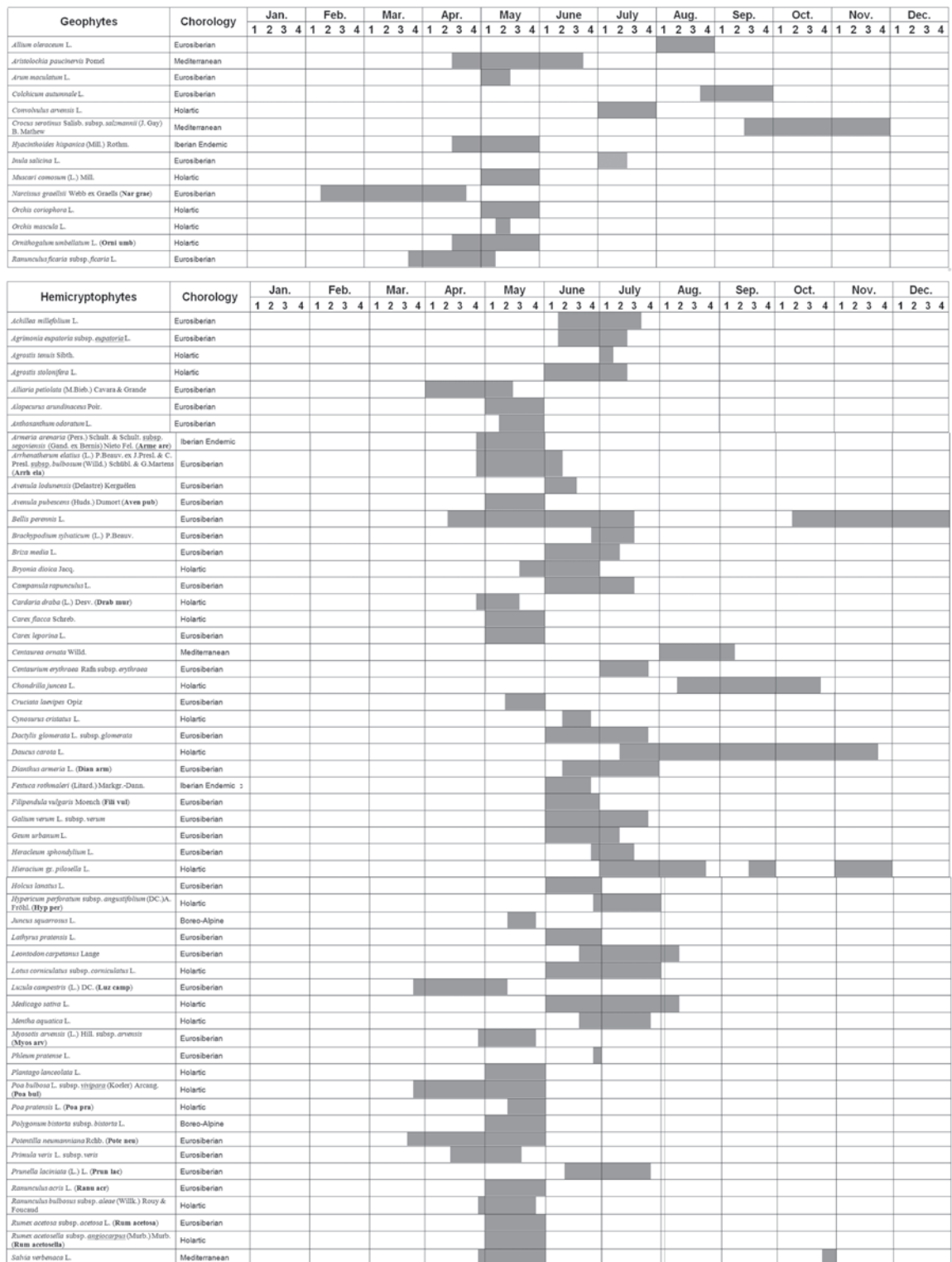


FIGURE S1. Duration of flowering found in 133 selected herbaceous species (117 genera and 37 families) throughout the annual cycle. The species are organized according to the biological types (geophyte, hemicryptophyte and therophyte) proposed in Raunkiaer’s (1934) biotype classification. Chorology was assigned following the criteria of Tutin *et al.* (1980), Bolòs and Vigo (1990) and Castroviejo *et al.* (1986-2012). Abbreviations used in the Canonical Correspondence Analyses (Figure 4) are indicated in brackets.

FIGURA S1. Duración de la floración observada a lo largo del ciclo anual en las 133 especies herbáceas seleccionadas (117 géneros y 37 familias). Las especies están organizadas de acuerdo con los tipos biológicos (geófitos, hemicriptófitos y terófitos) propuestos en la clasificación de biotipos de Raunkiaer’s (1934). La corología de cada especie fue asignada siguiendo el criterio de Tutin *et al.* (1980), Bolòs and Vigo (1990) y Castroviejo *et al.* (1986-2012). Las abreviaturas usadas en los Análisis de Correspondencias Canónicas (Figura 4) aparecen indicados entre paréntesis.

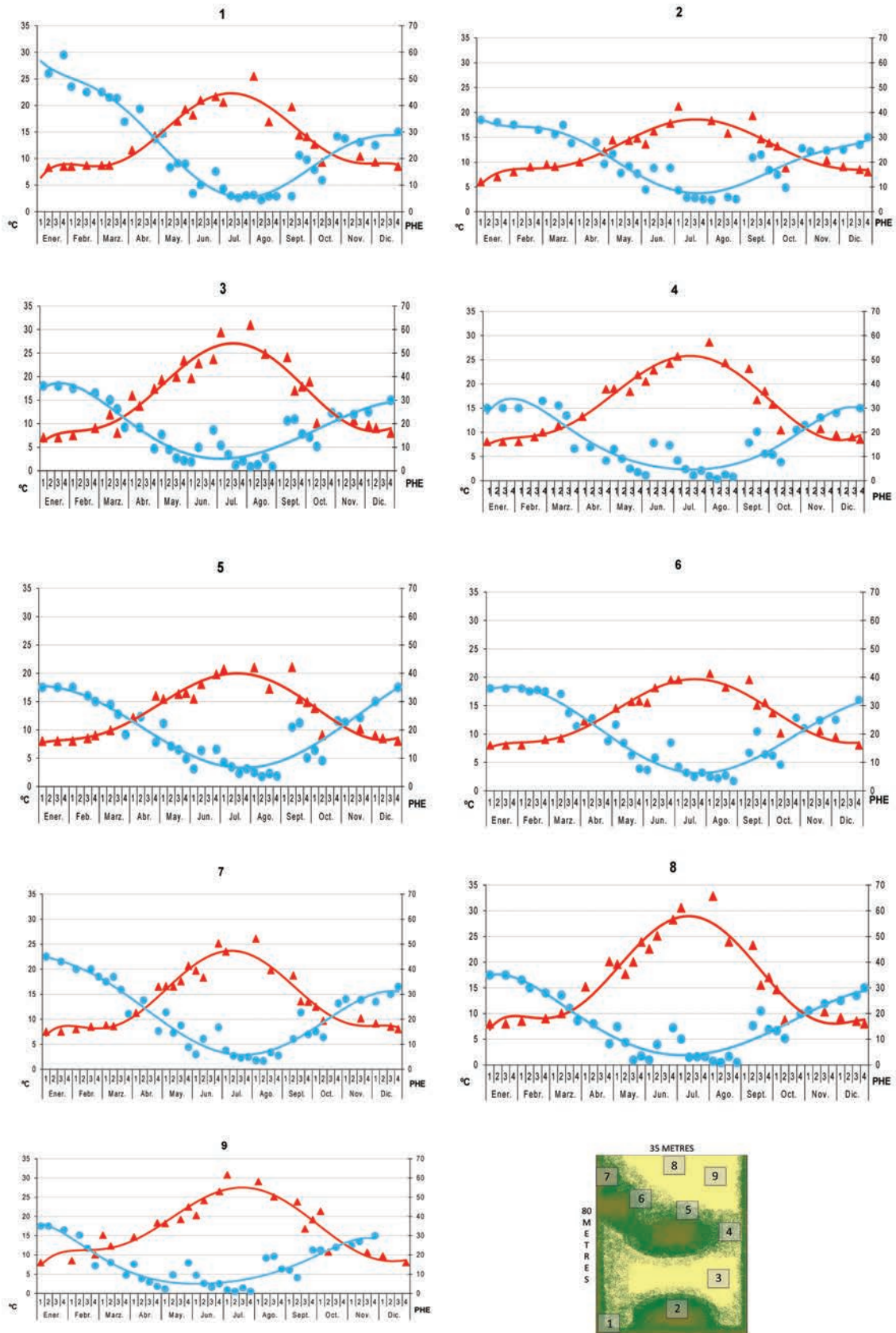


FIGURE S2. Edaphic Temperature (°C, red) and Edaphic Humidity Percentage (PHE, blue) curves, based on values registered in each of the study plots (1-9). Simplified map of the study area representing the location of the nine study plots and their proximity to the forest canopy.

FIGURA S2. Curvas de Temperatura edáfica (°C, rojo) y Porcentaje de Humedad Edáfica (PHE, azul) basadas en los valores registrados en cada uno de los cuadros de muestreo (1-9). Mapa simplificado del área de estudio representando la localización de los nueve cuadros de muestreo y su proximidad a la cobertura forestal.

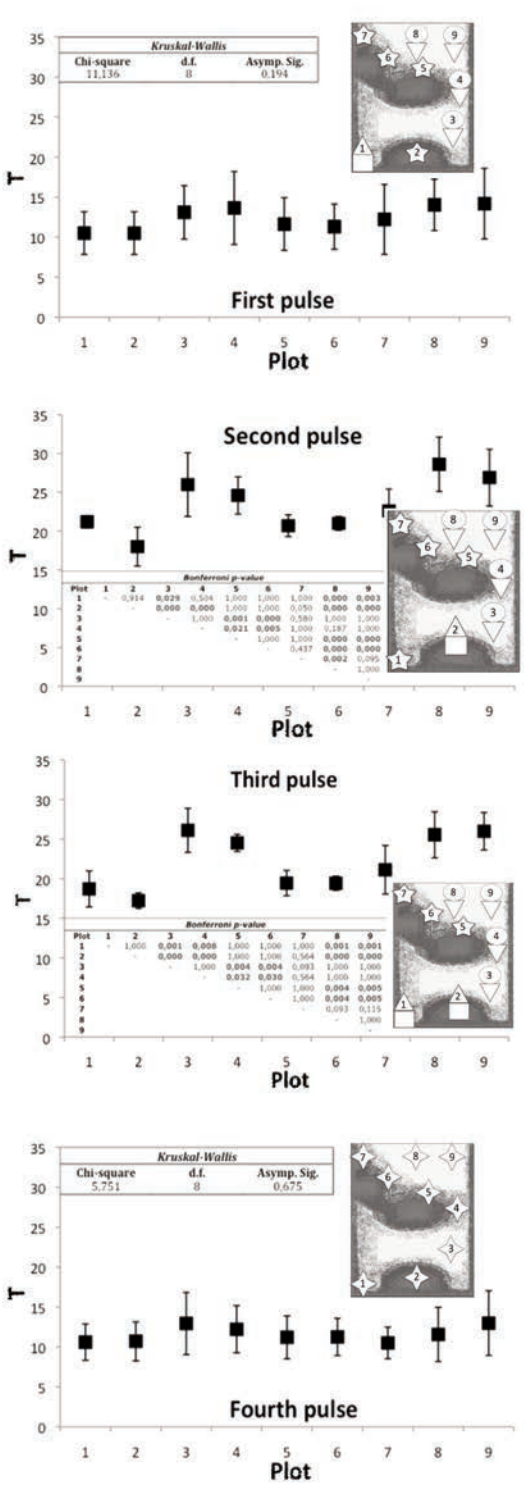
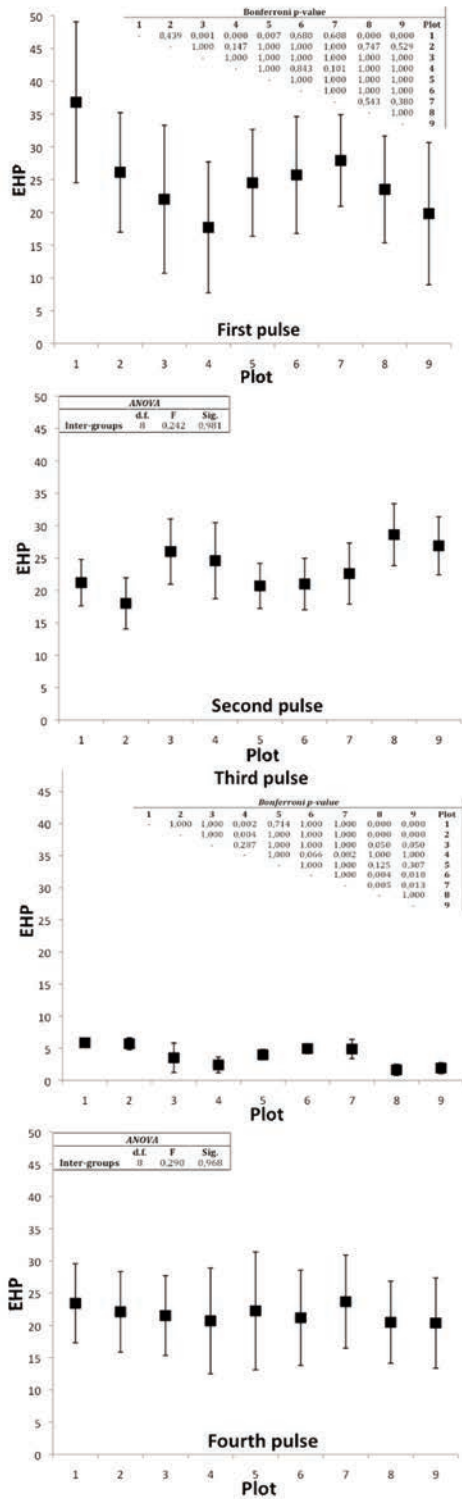


FIGURE S3. Representation of the mean and standard deviation of the environmental variables soil temperature (T) and edaphic humidity percentage (EHP) registered in each of the plots (1 - 9) in each pulse. The P-value from the parametric (ANOVA), and the non-parametric (Kruskal-Wallis) analyses performed are represented in the box-plots. The position and environmental conditions in each of the nine study plots throughout the four flowering pulses is also represented. The symbols for the plots are as follows: moister microenvironment (Δ), drier microenvironment (\circ), intermediate microenvironment (\ast), cooler microenvironment (\square), warmer microenvironment (∇), and homogeneous environmental conditions (\diamond).

FIGURA S3. Representación de la media y la desviación estándar de las variables ambientales temperatura edáfica (T) y porcentaje de humedad edáfica (EHP) registrada en cada cuadro de muestreo (1 - 9) en cada pulso. El P-valor de los análisis paramétricos (ANOVA) y no-paramétricos (Kruskal-Wallis) queda representado en las tablas incluidas en cada diagrama. Aparece también representada la posición y las condiciones ambientales de cada uno de los nueve cuadros de muestreo a lo largo de los cuatro pulsos de floración. Los símbolos usados son los siguientes: microambiente húmedo (Δ), microambiente seco (\circ), microambiente intermedio (\ast), microambiente frío (\square), microambiente cálido (∇), condiciones ambientales homogéneas (\diamond).



INFLUENCIA DEL PASTOREO DE ALFALFA O ESPARCETA SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y REPRODUCTIVOS DE OVEJAS Y CORDEROS

Sandra Lobón Ascaso, Mireia Blanco Alibés, Albina Sanz Pascua, Pablo José Rufino Moya, Francisco Molino Gahete y Margalida Joy Torrens*

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza).
Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

INFLUENCE OF ALFALFA OR SAINFOIN GRAZING ON PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PARAMETERS IN EWES AND LAMBS

Historial del artículo:

Recibido: 30/09/15

Revisado: 14/01/16

Aceptado: 22/03/16

Disponible online: 20/04/16

* Autor para correspondencia:

mjoy@aragon.es

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Palabras clave:

Calidad nutritiva, compuestos secundarios, metano, cubrición.

Keywords:

Nutritive value, secondary compounds, methane, mating.

RESUMEN

Se utilizaron parejas de oveja-cordero pastoreando en alfalfa (n=21) o esparceta (n=21) durante la lactación de primavera. Tras el destete, las ovejas permanecieron en las mismas parcelas hasta que finalizó el periodo de cubrición. A continuación se agruparon y mantuvieron el mismo manejo hasta el siguiente parto. A lo largo de la lactación, la producción de esparceta presentó un máximo a finales de abril y fue descendiendo hasta finales de mayo, mientras que la producción de alfalfa fue más homogénea en los diferentes cortes. Durante las primeras semanas de crecimiento (abril), ambos cultivos presentaron similar contenido en materia seca (MS), fibra neutro detergente (FND) y proteína bruta (PB). Posteriormente, la alfalfa presentó menor MS, FND y mayor PB que la esparceta (P<0,05). La esparceta presentó mayor contenido en taninos condensados totales y α -tocoferol que la alfalfa (P<0,05). La producción de gas y de metano dependió de la especie forrajera y del momento de aprovechamiento. Las ovejas presentaron similar peso y condición corporal de abril a junio, a partir de entonces las ovejas de alfalfa presentaron mayores pesos y condiciones corporales. Los corderos en pastoreo de alfalfa presentaron menor crecimiento diario que los de esparceta durante la lactación (P<0,05). La fertilidad de las ovejas tras el destete fue similar en ambos tratamientos (90,5%). La descendencia del siguiente parto de las ovejas de alfalfa presentó menor peso al nacimiento que la de esparceta (P<0,05), debido quizá a la mayor prolificidad (P<0,05). También se observó un desequilibrio en el ratio de hembras/machos, a favor de las hembras, aunque las diferencias no fueron significativas. El pastoreo de esparceta sería recomendable para aumentar la ganancia de los corderos en lactación, sin embargo las ovejas en alfalfa presentaron mayor prolificidad. Será necesario realizar futuros estudios para confirmar dichos resultados.

ABSTRACT

Ewe-lamb pairs grazed alfalfa (n=21) or sainfoin (n=21) parcels during spring lactation. After weaning, the dams grazed the same forages until mating. After mating, ewes were grouped and had the same management until the following lambing. Sainfoin production showed a maximum in late April and thereafter decreased with a minimum at the end of May, while the production of alfalfa was more constant. During the first weeks (April), both crops showed similar dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF) and crude protein (CP) contents. Afterwards, alfalfa had lower DM, NDF and greater CP (P < 0.05) contents than sainfoin. Sainfoin showed higher α -tocopherol content and total condensed tannins than alfalfa (P < 0.05). The gas and methane production depended on the forage species and the time of use. Ewes had similar live weight and condition score from April to June. After this time, Alfalfa ewes were heavier and had better condition scores than Sainfoin ewes. Alfalfa lambs had lower daily gains than Sainfoin lambs during lactation (P<0.05). Fertility rate was similar in both groups (90.5%). The Alfalfa offspring was lighter at lambing than the Sainfoin offspring (P<0.05), probably due to the higher prolificacy (P<0.05). An imbalance in the ratio female/male for females was observed in the Sainfoin ewes, although the differences were not significant. Therefore, grazing sainfoin would be advisable to increase weight gains of lambs in lactation, and grazing alfalfa during mating was associated with an increased prolificacy. Future studies will be needed to confirm these results.



Ovejas junto a sus corderos pastando esparceta (izquierda) y alfalfa (derecha) durante el periodo de lactación.



Ewes with their lambs grazing sainfoin (left) and alfalfa (right) during the lactation period.

© Mireia Blanco

INTRODUCCIÓN

La esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop.) y la alfalfa (*Medicago sativa* L.) son dos leguminosas forrajeras plurianuales muy utilizadas en los secanos del noreste de España. Ambos forrajes presentan una gran capacidad productiva, un alto valor nutritivo y una acción restauradora de la fertilidad del suelo. Estas dos especies tienen características comunes, pero también presentan diferencias notables, entre las que destaca la presencia de taninos condensados en la esparceta pero no en la alfalfa. Según diversos autores, los taninos condensados podrían afectar indirectamente a parámetros productivos y a determinados parámetros ruminales, ya que son capaces de unirse a las proteínas en el rumen disminuyendo su degradación y favoreciendo el flujo al intestino donde la absorción de aminoácidos es mayor (Waghorn *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1996; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Waghorn, 2008). Sin embargo, los resultados difieren entre estudios, ya que muchos factores están implicados, entre los que destacan la estructura y la cantidad de taninos condensados presentes en el alimento (Min *et al.*, 2003). Dichos taninos tienen efectos positivos sobre la salud animal por sus propiedades antihelmínticas (Niezen *et al.*, 1995; Molan *et al.*, 2000) y por la prevención del meteorismo en los rumiantes, problema que sí se detecta en el pastoreo de gran cantidad de alfalfa (Jones *et al.*, 1973), tras una restricción alimenticia.

La alimentación materna durante las primeras etapas del desarrollo embrionario puede ser determinante para la vida adulta, ya que es el momento en el que se producen cambios sustanciales que condicionarán la diferenciación celular del embrión (Rhind, 2004). En los últimos años se han estudiado los efectos de la subnutrición y sobrealimentación alrededor de la cubrición (Abecia, *et al.*, 2006; Bloomfield, 2011). Sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre los efectos que puede tener el tipo de alimentación que pastan las ovejas entre el destete y la cubrición sobre los rendimientos productivos y reproductivos o sobre su descendencia.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar, por una parte la composición química y los contenidos en carotenoides, α -tocoferol y taninos condensados totales en los cultivos de alfalfa y de esparceta durante su ciclo productivo (abril-agosto); y por otra parte el rendimiento de las ovejas y los corderos mantenidos en pastoreo de alfalfa o esparceta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El manejo de los animales siempre se realizó bajo las directrices de la normativa vigente referente a experimentación animal de la Unión Europea (European Communities, 1986).

Diseño experimental

El ensayo se realizó en la Finca Experimental del Soto Lezcano, en Zaragoza, en dos parcelas preparadas para riego a manta, que es la práctica habitual en la finca. Las labores de preparación del suelo, previas al establecimiento del ensayo, consistieron en un pase de chisel seguido de dos pases de grada. Como abonado de fondo se aportaron 100 kg/ha del complejo NPK 0-10-10. No se aplicaron herbicidas de presiembrá. Las dosis de siembra fueron de 90 y 25 kg/ha para la esparceta y alfalfa, respectivamente, dosis habituales en la zona para dichos cultivos. Cada cultivo tenía una superficie de 1 ha, que se dividía en 5 parcelas para llevar a cabo la rotación semanal de los animales en pastoreo. La siembra del ensayo se realizó en septiembre de 2013 y en primavera del 2014 fue cuando se inició el pastoreo.

Se realizó una cubrición controlada de todo el rebaño en octubre del 2013, con el fin de disponer de corderos con similares condiciones de peso y edad. Tras el parto se utilizaron 42 parejas oveja-cordero macho de la raza Rasa Aragonesa, de parto simple. Se hicieron 2 lotes homogéneos en peso, condición corporal y edad de las madres, así como en peso de los corderos. El periodo experimental (Figura 1) duró desde el inicio de la paridera (3 abril 2014) hasta el final de

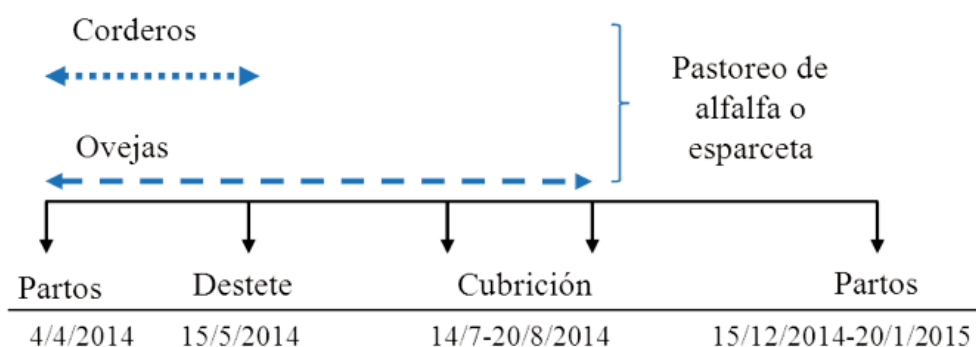


FIGURA 1. Diseño experimental del ensayo, pastoreo de ovejas (desde el parto hasta final de la cubrición) y corderos (durante la lactación) en praderas de alfalfa y esparceta.

FIGURE 1. Experimental design. Ewes (from lambing to the end of mating) and lambs (during lactation) grazing alfalfa or sainfoin.

la siguiente cubrición de las ovejas (20 agosto 2014), aunque los controles realizados se prolongaron hasta la siguiente paridera (enero 2015). Las parejas oveja-cordero se dividieron en 2 tratamientos:

- Pastoreo de alfalfa (*Medicago sativa* L, cv Aragón): Ovejas y corderos en pastoreo rotacional durante la lactación desde el parto hasta los 45 días de vida. En este momento los corderos se destetaron, se estabularon y se cebaron con concentrado. Las ovejas permanecieron en las praderas de alfalfa hasta el final de la siguiente cubrición (n=21).
- Pastoreo de esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop, cv Reznos): El mismo manejo que el grupo anterior, pero en este caso se utilizó esparceta como forraje (n=21).

Durante la lactación, todos los corderos tuvieron acceso a la leche materna, al pasto y al concentrado *ad libitum* (proteína bruta (PB): 20,3 % materia seca (MS), fibra neutro detergente (FND): 16,3 % MS, fibra ácido detergente (FAD): 3,4 % MS, lignina ácido detergente (LAD): 0,54 % MS). Las ovejas no recibieron ninguna suplementación durante el pastoreo. Tras el destete de los corderos, las ovejas permanecieron en sus respectivas parcelas de alfalfa o esparceta. A mediados de julio se introdujeron machos en cada una de los cultivos para realizar la cubrición controlada por monta natural durante 35 días. Después, las ovejas de ambos grupos se reagruparon y siguieron el mismo manejo y alimentación. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y sales minerales.

Muestreo y controles

Durante la lactación (40-45 días de media), semanalmente los animales rotaban de parcela. Previo a la entrada de los animales se llevaba a cabo un muestreo de forraje para estimar la producción. Para ello se tomaron, al azar, 5 muestras de 0,25 m² por parcela. Tras el destete, las ovejas pasaron a tener un manejo general, en el que se aseguró la disponibilidad del cultivo correspondiente.

Desde el parto hasta el destete, todos los animales se pesaron semanalmente con una balanza electrónica (0,1 kg de precisión). La ganancia media diaria de los corderos se estimó por regresión lineal del peso sobre la edad.

Tras el destete, se controló el peso y la condición corporal de las ovejas y se registraron los parámetros reproductivos del siguiente ciclo (enero 2015): la fertilidad (número de ovejas paridas por 100 ovejas cubiertas), prolificidad (media de corderos nacidos vivos y muertos por ovejas paridas) y fecundidad (media de corderos nacidos vivos y muertos por ovejas cubiertas). Se calculó la mortalidad en el periparto y el ratio de hembras/machos nacidos en el parto posterior al pastoreo de los cultivos de alfalfa y esparceta.

Análisis químicos

Las muestras de forraje se pesaron y se dividieron en tres submuestras. Una submuestra fue desecada a 60°C en estufa de ventilación forzada hasta peso constante y se destinó a la determinación de la composición química. Otra submuestra se congeló a -20°C y se liofilizó para la determinación de taninos condensados totales. La tercera submuestra fue almacenada a 4°C hasta el día siguiente del muestreo, para la determinación de carotenoides y tocoferoles de los alimentos en fresco. Una vez que las muestras estaban secas se procedió a su molienda con un molino de cuchillas provisto de una malla de 1 mm de diámetro para la composición química y producción de gas y 0,2 mm para la determinación de taninos condensados totales. Una vez molidas, las muestras se almacenaron hasta posterior análisis.

Los análisis químicos de la materia seca del alimento y el contenido en cenizas se determinaron de acuerdo con los métodos AOAC, el contenido en PB por el método Dumas (AOAC, 1999) y el contenido en FND, FAD y LAD por el método Van Soest *et al.*, (1991).

Para la determinación de los contenidos en carotenoides y en tocoferoles se evitó que el alimento estuviera expuesto a la luz solar, analizándose muestras semanalmente desde la lactación hasta el inicio del verano. La metodología seguida para la extracción de dichos compuestos fue la de Val *et al.*, (1994). Se pesaron 0,2 g de alimento con una balanza de precisión y se introdujeron en un tubo falcón de 15 ml protegido de la luz. Posteriormente, se añadieron 0,03 g de ascorbato de sodio y 5 ml de acetona. Seguidamente, los tubos se taparon y se homogenizaron con un ultra-turrax (ART-MICCRAD-8) durante 30 segundos. Para una extracción mejor de los carotenoides y tocoferoles, los tubos se pasaron a un homogeneizador vertical donde permanecieron durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se extrajo el sobrenadante del tubo con una pipeta Pasteur de 1 ml y se trasvasó a un vial ámbar tras su filtrado a través de una membrana de 0,45 micras.

El retinol, la luteína, el β -caroteno, α -tocoferol y γ -tocoferol se determinan por cromatografía de líquidos de alta resolución (UHPLC, Acquity H-Class, Water; Milford, Massachusetts, EE. UU). La separación de los compuestos se realizó con una columna Kinetex RP C₁₈, de 100x4,6 mm y 2,1 micras, estando dicha columna en línea con un filtro pre-columna Krud-Katcher ultra HPLC. El equipo de cromatografía líquida estaba equipado con dos detectores, un detector de red de fotodiodos con un barrido de 210 a 600 nm y otro de fluorescencia. La luteína y el β -caroteno se detectaron con el detector de red de fotodiodos a 450 nm, el retinol con el detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 317 nm y de emisión (λ_{em}) de 468 nm, y finalmente, los tocoferoles con el detector de fluorescencia a λ_{ex} 293 nm y λ_{em} 322. La fase móvil era metanol (con 0,05% de trietanolamina) con un flujo de 1,5 ml/min en isocrático. El análisis se llevó a cabo a una temperatura controlada, usando un horno de columna a 35°C y una cámara de muestras preinyección a 15°C en el automuestreador. El tiempo de análisis fue de 6 minutos. Los compuestos se identificaron mediante la comparación con los tiempos de retención y espectro de sus respectivos estándares (>95%). La disolución de los respectivos estándares (Sigma Aldrich) se realizó en metanol evitando el contacto con la luz y se guardaron a -80°C. La concentración exacta se determinó por espectrofotometría. Se realizaron hasta siete disoluciones por cada estándar (500 a 0,1 μ g/ml) para elaborar una curva de calibración con siete puntos. También se efectuó una evaluación preliminar de la metodología analítica empleada que incluyó estudios de especificidad, sensibilidad, recuperación y precisión.

La cuantificación de los taninos condensados totales se realizó mediante la técnica de HCl-Butanol siguiendo el método de Grabber *et al.*, (2013). Se pesaron 0,03 g de muestra previamente liofilizada y molida en tubos de 12 ml, se añadieron 10 ml del solvente de extracción (3,3 ml de agua, 5,0 ml de HCl 12 M, 42 ml de n-butanol y 50 ml de acetona) y se agi-

taron durante 20 minutos en vórtex orbital múltiple. Los tubos se calentaron a 85°C durante 2 horas, se enfriaron durante 15 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se leyeron con el espectrofotómetro Helios Beta (Thermo Electron Corporation, España) a 550 nm. La concentración se expresó en equivalente de cianidina, la cual se utilizó como estándar.

La producción de gas y la estimación de la desaparición de la materia seca se realizaron utilizando el sistema de Ankom (Ankom technology, NY, EE. UU.). Dicho sistema utiliza botes de 310 ml de capacidad, dotados de un sensor de presión y de temperatura. Se seleccionaron 5 muestras de cada forraje espaciado en el tiempo (15-4, 28-4, 8-5, 17-6, 5-8). Se pesaron las muestras (0,5 g), previamente secadas y molidas siguiendo la metodología anteriormente expuesta, y se incubaron con 60 ml de la solución tamponada de saliva:líquido ruminal (2:1 v/v) durante 24 horas. El líquido ruminal procedía de 4 moruecos fistulizados en rumen y alimentados con una dieta constituida por heno de alfalfa (PB: 18,46% MS, FND: 44,46% MS, FAD: 34,31% MS y LAD: 7,21% MS) y cebada en una proporción de 70:30. Los animales tenían libre acceso a agua y minerales. El líquido ruminal se obtuvo antes de la ingestión de la dieta por la mañana y se trasladó inmediatamente al laboratorio. Tras ser filtrado a través de cuatro capas de gasa, se hizo un pool de los cuatro líquidos ruminales para reducir los efectos que pudiera tener el líquido ruminal o el ambiente en una tanda, como sugiere Udén *et al.* (2012). El líquido ruminal se mezcló con la solución tampón, basado en el protocolo de Menke y Steingass (1988) en una proporción 1:2. La solución final se colocó en un baño a 39°C con un flujo continuo de CO₂. Cada muestra se analizó por triplicado en una única tanda. Se añadieron tres blancos con el fin de corregir la producción de gas del líquido ruminal sin muestra. A las 24 horas se recogieron 8 ml de gas en tubos de 5 ml para la cuantificación de la producción de metano. El metano se determinó con detector de ionización de llama (Cromatógrafo de gases H-P4890), equipado con una columna capilar GS-DB-WAX (J&N Scientific), 30 m, 0,25 mm id y 0,25 micras de espesor del film. El gas conductor utilizado fue el helio con un ratio de flujo 1 ml/min. Las tasas de flujo de helio y aire sintético fueron 35 y 350 ml/min, respectivamente. La temperatura de la entrada, del detector y del horno se mantuvo a 200, 250 y 70°C (programa isotérmico), respectivamente. El volumen de inyección fue de 200 μ l. Cada muestra se inyectó manualmente con una jeringa hermética Hamilton. La identificación del metano se basó en el tiempo de retención comparado con el metano estándar. El tiempo de análisis fue de 3 minutos (incluido el tiempo de estabilización). Las producciones de gas y de metano se expresaron como el total producido (ml/g MS). La muestra incubada junto con su líquido ruminal se traspasó a sacos de nylon de 49 micras de diámetro, los cuales se pesaron y se desecaron para estimar la desaparición de la materia seca.

	Forraje		e.e. ¹	A	P-valor	
	Alfalfa	Esparceta			Forraje	A*Forraje
Materia seca	22,17	22,97	0,21	0,001	0,32	0,001
Cenizas	9,36	7,95	0,05	0,001	0,001	0,001
Proteína bruta	22,75	16,34	0,13	0,001	0,001	0,001
Fibra neutro detergente	39,60	45,38	0,30	0,001	0,001	0,001
Fibra ácido detergente	25,54	32,32	0,26	0,001	0,001	0,001
Lignina ácido detergente	5,21	8,26	0,18	0,001	0,001	0,12

¹ error estándar de la media.

TABLA 1. Valores medios de la composición química de la alfalfa y la esparceta (% sobre materia seca) y significancia (P) de los efectos momento de aprovechamiento (A), tipo de forraje e interacción de ambos.

TABLE 1. Mean values of chemical composition of alfalfa and sainfoin (% of dry matter) and significance (P) of the effects grazing time (A), forage type and their interaction.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SAS (v.9.3). Se realizaron análisis de varianza de los parámetros producción y calidad del forraje, contenido en compuestos secundarios, y producción de gas y de metano con un modelo lineal general (procedimiento GLM), con el tratamiento y las semanas de aprovechamiento como efectos fijos. Los pesos de las ovejas y de los corderos se analizaron mediante el análisis de medidas repetidas (procedimiento MIXED), con el tipo de alimento, la fecha y sus interacciones como efectos fijos y el animal como efecto aleatorio. Se obtuvieron las medias mínimo cuadráticas, el error estándar (e.e.) y se compararon las medias mediante el test de Tukey. La fertilidad, el ratio hembras/machos y la mortalidad al parto se analizaron mediante una prueba χ^2 (procedimiento FREQ) mediante el test de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción forrajera

Durante la lactancia del cordero la evolución de la producción de alfalfa y esparceta fue diferente. La producción de esparceta fue más concentrada, con un máximo a finales de abril ($7568 \pm 39,81$ kg MS/ha), siendo superior en ese momento a la de alfalfa ($3994 \pm 9,6$ kg MS/ha). Posteriormente, la producción de esparceta fue disminuyendo hasta alcanzar un mínimo de 1380 kg MS/ha a principios de mayo. Dicho comportamiento concuerda con lo esperado, ya que la esparceta es un cultivo que se caracteriza por concentrar la producción de forraje en primavera, además de tener una baja capacidad de rebrote tras el primer corte y mucho menor que la que presenta la alfalfa. Por el contrario, la producción de alfalfa estuvo más repartida durante todo el periodo de aprovechamiento, presentando unas producciones mínimas y máximas de $1391 \pm 6,6$ (22 de abril) y $4314 \pm 71,9$ kg MS/ha (8 de mayo), respectivamente. Cuando se estudia todo el ciclo productivo la alfalfa, debido a su capacidad de producir rebrotes de elevada producción, presenta una mayor producción frente a la esparceta en regadío (Martiniello, 1998; Peel *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2008).

La composición química de los dos forrajes se determinó desde el inicio del pastoreo tras los partos de primavera hasta la posterior cubrición de las ovejas (abril a agosto), dado que uno de los objetivos era estudiar el efecto de la composición del forraje sobre algunos parámetros reproductivos. Se observó que la composición química estaba afectada por la interacción entre el momento de aprovechamiento y el forraje, tal y como se muestran en la Tabla 1. De media, la alfalfa presentó un mayor contenido en PB y un menor contenido en FND, FAD y LAD que la esparceta ($P < 0,001$). Desde abril hasta principio de junio ambos cultivos tuvieron contenidos similares en MS, PB y FND, pero a partir de dicha fecha la alfalfa presentó menor MS y FND y mayor PB que la esparceta ($P < 0,05$; Figura 2). A pesar de dichas diferencias, las dos leguminosas presentaron una evolución similar. Las primeras semanas de producción presentaron contenidos en MS y FND bajos, y alto contenido en PB, evolucionando inversamente hasta el corte de principios de mayo, momento en el cual la planta estaba madura y presentaba el mayor contenido en MS ($> 30\%$) y FND ($> 55\%$) y un menor contenido en PB ($< 12\%$) en ambos forrajes. Tal y como era de esperar, la mayor producción forrajera coincidió con la menor calidad nutritiva de las plantas, aunque durante todo el periodo de estudio el aprovechamiento por parte de los animales siempre se realizó entre periodo vegetativo (alfalfa) o vegetativo-inicio floración (esparceta).

Contenido de compuestos secundarios en los forrajes

Se determinaron los compuestos secundarios (taninos condensados, luteína, b-caroteno y α -tocoferol) de los forrajes semanalmente desde la lactación hasta el inicio del verano. El contenido medio en taninos condensados totales fue muy escaso en la alfalfa (1,78 g equivalente cianidina/kg MS), mientras que la esparceta presentó un contenido muy superior (20,3 g equivalente cianidina/kg MS). En cuanto a su evolución, la alfalfa presentó un contenido constante durante todo el periodo de estudio, mientras que la esparceta presentó menores contenidos en los cortes en los que la producción forrajera era mayor, lo que pudo ser debido a una mayor proporción de tallos que de hojas, siendo en estas últimas donde más taninos condensados se depositan (Figura 3). La esparceta es una leguminosa con un

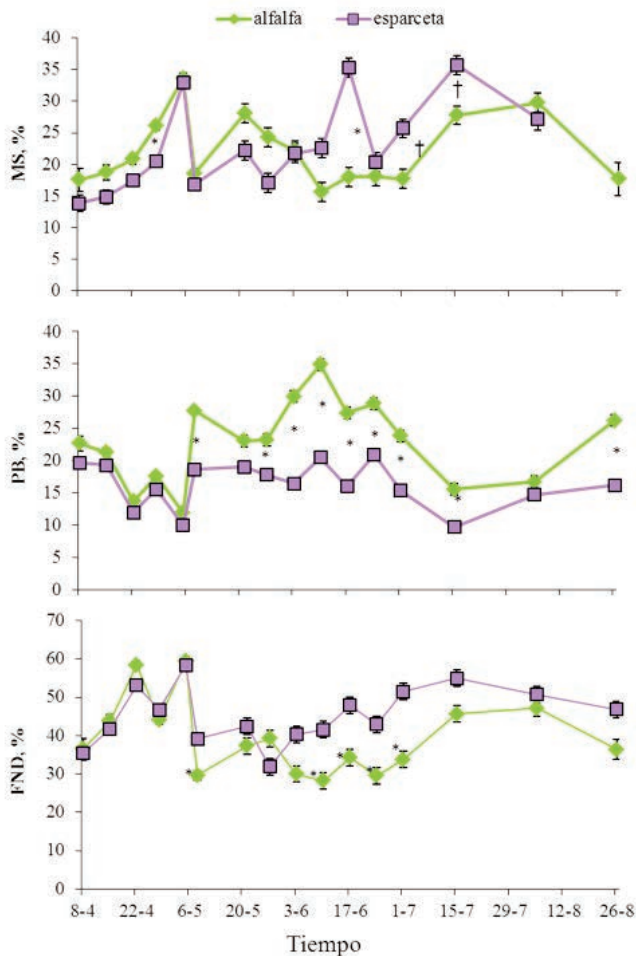


FIGURA 2. Evolución del contenido en materia seca (MS), proteína bruta (PB) y fibra neutro detergente (FND) de la alfalfa y la esparceta durante el periodo de pastoreo (de abril a agosto). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, * :P<0,05; †:P<0,1.

FIGURE 2. Evolution of the content of dry matter (DM), crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) of alfalfa and sainfoin during the grazing period (from April to August). Differences between forages at the same time, * :P<0,05; †:P<0,1.

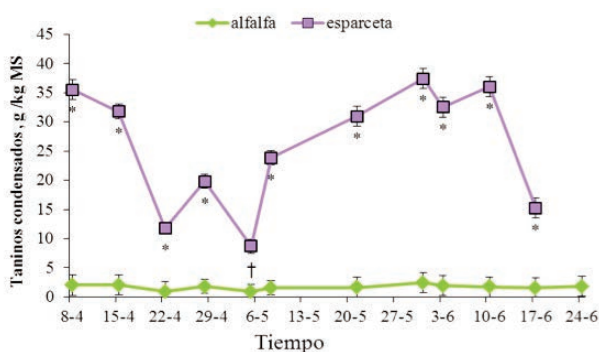


FIGURA 3. Evolución del contenido en taninos condensados totales (g equivalentes cianidina / kg MS) de la alfalfa y la esparceta durante la lactación de primavera (de abril a junio). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, * :P<0,05; †:P<0,1.

FIGURE 3. Evolution of total condensed tannins content (equivalents cyanidin g / kg DM) of alfalfa and sainfoin during lactation in spring (from April to June). Differences between forages at the same time, * :P<0,05; †:P<0,1.

gran porte, que a medida que crece desarrolla mucho tallo, disminuyendo en su proporción de hojas. Por tanto, la mayor concentración de taninos condensados se da en el estadio vegetativo-inicio floración de la esparceta, de acuerdo con Theodoridou *et al.*, (2010), que también observaron en la esparceta un mayor contenido de taninos condensados en las hojas frente a los tallos, y también en el comienzo de la floración frente al final de la misma.

Los contenidos medios de luteína, b-caroteno y α -tocoferol de la alfalfa y esparceta a lo largo del periodo estudiado se expresan en la Figura 4. En líneas generales, la esparceta presentó mayor contenido en α -tocoferol que la alfalfa a lo largo del periodo estudiado. El contenido en carotenoides en la esparceta también fue superior al inicio del estudio (5 primeras semanas), igualándose durante las siguientes semanas (4 semanas siguientes coincidiendo en el mes de mayo) y disminuyendo su contenido en los últimos muestreos (junio). Estos resultados podrían estar parcialmente relacionados con el diferente esquema de crecimiento y con la variación en la proporción hoja:tallo a lo largo del ciclo productivo en ambas leguminosas. Las hojas contienen entre 5 y 10 veces más carotenoides que los tallos (Livingston *et al.*, 1968). Además, puede haber diferencias entre las dos leguminosas en la capacidad de almacenar dichos compuestos. Al inicio del periodo productivo (abril-principio de mayo) la planta presenta un estadio vegetativo, con una elevada proporción de hojas y un tallo poco lignificado, lo que se traduce en un bajo contenido en FND y elevado contenido en PB, coincidiendo con una producción media de forraje y unos elevados contenidos en carotenoides y tocoferol. Sin embargo, cuando se alcanzó una mayor producción de forraje, ambas leguminosas registraron una reducción notable del contenido en luteína y b-caroteno (P<0,05), lo que puede ser debido a la mayor relación tallo:hoja. Estos resultados deberían considerarse cuando se estudian posibles herramientas para certificar el sistema de alimentación recibido por el animal (Prache *et al.*, 1999).

Producción de gas, de metano y desaparición de materia orgánica *in vitro*

Debido a que la técnica de producción de gas *in vitro* tiene una alta variabilidad, se utilizó una mezcla del líquido ruminal de cuatro moruecos para reducirla. Sin embargo, para obtener resultados concluyentes y/o extrapolables a futuros ensayos, sería necesaria la realización de varias réplicas de tandas, de tal manera que cada una se comportara como una repetición. No obstante, estos resultados nos pueden aportar una aproximación de lo que podría estar pasando *in vivo*.

Para estudiar la producción de gas de ambos cultivos, se tomaron 5 muestreos (15/4, 28/4, 8/5, 17/6, 5/8) con el fin de evaluar la influencia del momento del corte en dicho parámetro. La evolución de la producción de gas y metano y la desaparición de la materia orgánica (DMO) *in vitro* se muestra en

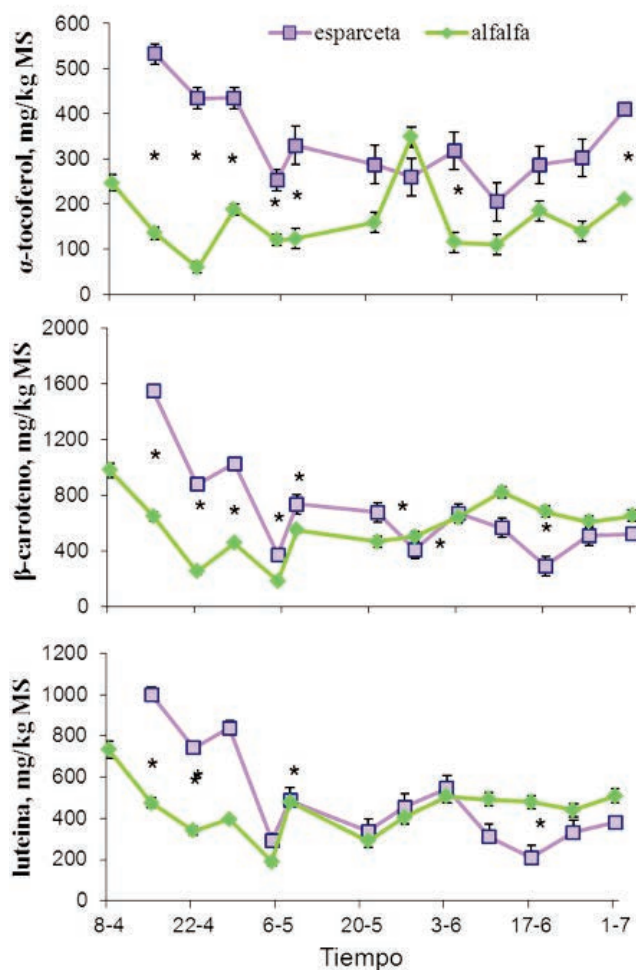


FIGURA 4. Evolución de los contenidos en α -tocoferol, β -caroteno y luteína en la alfalfa y esparceta según el momento del pastoreo (de abril a julio). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, * $P < 0,05$.

FIGURE 4. Evolution of α -tocopherol, β -carotene and lutein contents in alfalfa and sainfoin depending on the timing of grazing (from April to July). Differences between forages at the same time, * $P < 0.05$.

la Figura 5. Respecto a estos parámetros, se observó una interacción entre el tipo de forraje y el momento de aprovechamiento ($P < 0,01$). Los dos forrajes se comportaron de forma similar al inicio de su ciclo productivo (abril) en todos los parámetros *in vitro* estudiados, con valores similares en las producciones de gas y de metano y de DMO ($P > 0,05$). Sin embargo, en el último muestreo realizado en agosto, se observó una reducción de la producción de gas y de metano, así como de la DMO ($P < 0,01$) en relación a los demás cortes.

La alfalfa presentó unas producciones de gas y metano similares entre muestreos, excepto en el muestreo de agosto, que tuvo una producción inferior. En cuanto a la desaparición de la materia, se observó una mayor DMO en los cortes de mayo y junio, probablemente porque la planta estaba en un estadio vegetativo, mientras que en los cortes anteriores y en el posterior de agosto el estadio sería de inicio de botón floral.

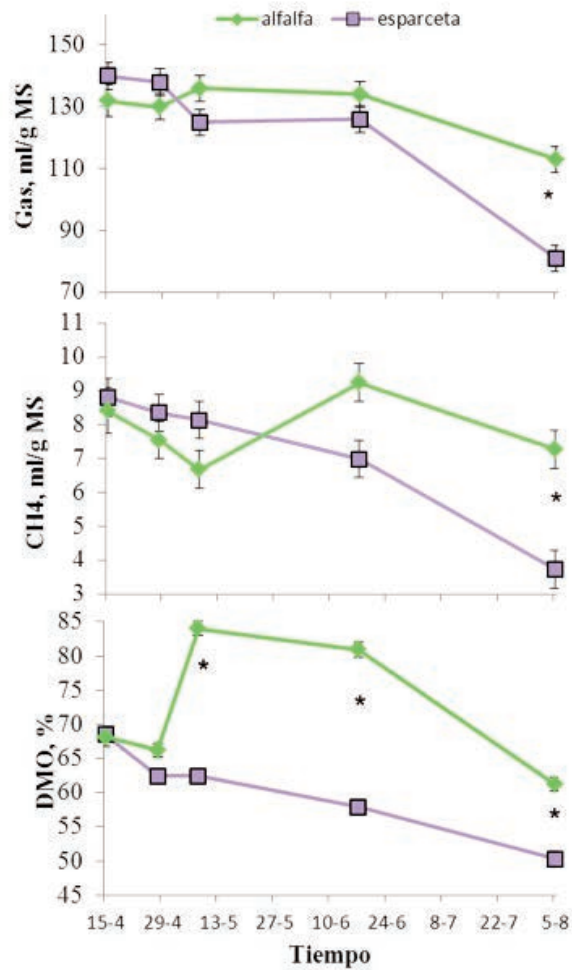


FIGURA 5. Producción de gas y de metano en ml/g MS y desaparición de la materia orgánica (% DMO) *in vitro* de la alfalfa y de la esparceta según el momento del pastoreo (de abril a agosto). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, * $P < 0,05$

FIGURE 5. *In vitro* gas and methane in ml/g DM and organic matter disappearance (% OMD) of alfalfa and sainfoin depending on the timing of grazing (from April to August). Differences between forages at the same time, * $P < 0.05$.

En cuanto a la esparceta, su producción de gas y de metano fue inferior a la de la alfalfa, aunque de forma significativa únicamente en el corte de agosto ($P < 0,05$). Se ha demostrado que los taninos condensados pueden reducir los gases de efecto invernadero (Kingston-Smith *et al.*, 2010). Algunos autores han observado una reducción de la producción de metano cuando se incluye esparceta en estudios *in vitro* (Theodoridou *et al.*, 2011b) e *in vivo* (Waghorn, 2008; Theodoridou *et al.*, 2011a). La falta de efecto claro de los taninos sobre la producción de gas está de acuerdo con los resultados observados por Hatew *et al.* (2015), quienes concluyeron que la estructura de los taninos condensados es más importante que el contenido. De ahí la controversia que existe en la actualidad con relación a la influencia de los taninos condensados sobre la producción de metano.

La reducción de la producción de gas y metano podría estar más relacionada con la reducción de la tasa de DMO. La

DMO de la esparceta fue disminuyendo a medida que avanzaba la fecha de aprovechamiento, presentando en el último muestreo una DMO inferior a la presentada a principios de abril ($P < 0,05$). Si se comparan las dos forrajeras, la alfalfa presentó una DMO mayor a la registrada en la esparceta ($P < 0,05$) excepto en los dos primeros muestreos ($P > 0,05$). Todo ello puede estar relacionado con la mayor proporción de tallos de la esparceta, al ser una planta con mayor porte, especialmente en primavera.

Parámetros productivos y reproductivos de los animales

La evolución del peso de los corderos criados junto con sus madres en parcelas de alfalfa o esparceta se muestran en la Figura 6. Los corderos del tratamiento de alfalfa presentaron menor ganancia media diaria durante la lactación que los corderos del lote de esparceta (269 vs. 302 g, $P < 0,05$), pese a que la alfalfa presentó una mejor calidad, lo que puede estar relacionado con la presencia de determinados compuestos secundarios en estos forrajes, como los taninos condensados. Así, Dawson *et al.* (2011) observaron una mayor ganancia diaria en corderos destetados en pastoreo con la inclusión de taninos condensados (procedente del quebracho) en el concentrado con un bajo contenido en proteína; sin embargo no encontraron diferencias cuando el concentrado tenía un alto contenido en proteína. Al-Dobaib (2009) también mostró una mejora en las ganancias de los corderos con la inclusión de 2 % de quebracho en la dieta de corderos alimentados con alfalfa; en cambio cuando la inclusión fue del 1 y 3 % de quebracho no observó ningún efecto. Estos incrementos de las ganancias de peso debidos a los taninos condensados se atribuyen a la combinación del incremento del flujo de proteína en el intestino delgado y la disminución de la producción de metano en el rumen (Min *et al.*, 2006). Por lo tanto, el efecto de los taninos condensados sobre las ganancias de los corderos depende de la dosis, del contenido de proteína en la dieta y del tipo de tanino condensado. La edad al destete fue similar en ambos lotes (41 días), por lo que al presentar mejores crecimientos los corderos de esparceta tendieron a ser más pesados al destete ($P = 0,10$).

La evolución del peso y la condición de las ovejas durante todo el periodo de pastoreo se muestra en la Figura 7. Durante la lactación, las ovejas de ambos lotes presentaron similar peso (51,2 kg \pm 1,2 vs. 51,3 kg \pm 1,2, para alfalfa y esparceta, respectivamente) y condición corporal. Sin embargo, tres semanas antes de empezar la cubrición y durante la misma las ovejas que pastaron alfalfa presentaron mejor estado corporal que las de esparceta ($P < 0,05$), posiblemente debido a la menor producción y calidad de la esparceta en los cortes finales.

Los parámetros reproductivos de las ovejas que se cubrieron en parcelas de alfalfa o esparceta y los pesos vivos de su

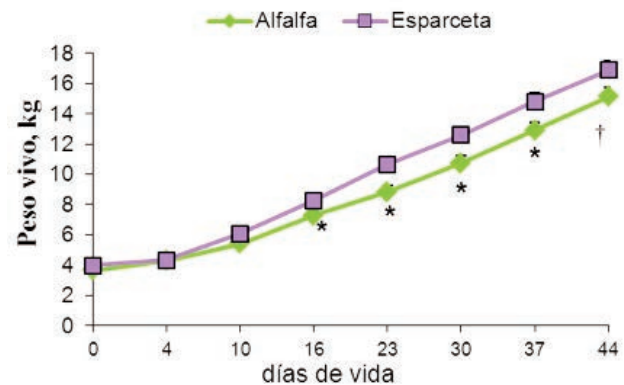


FIGURA 6. Evolución del peso de los corderos durante el periodo de lactación junto con sus madres en parcelas de alfalfa o esparceta (de abril a mayo). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, *: $P < 0,05$; †: $P < 0,1$.

FIGURE 6. Evolution of lamb weight during the lactation period with their dams in plots of alfalfa or sainfoin (from April to May). Differences between forages at the same time, *: $P < 0.05$; †: $P < 0.1$.

	Alfalfa	Esparceta	e.e. ¹	P-valor
Número de ovejas	21	21		
Fertilidad (%)	91	90		0,99
Prolificidad (corderos/parto)	1,9	1,5	0,1	0,02
Mortalidad al nacimiento (%)	25,7	7,4		0,26
Ratio hembra/macho	57/43	72/28		0,23
Numero de corderos vivos	28	25		
Peso al nacimiento (kg)	3,5	4,3	0,2	0,02
de las hembras (kg)	3,4	4,3	0,2	0,01
de los machos (kg)	3,7	4,5	0,2	0,08

¹ error estándar de la media.

TABLA 2. Parámetros reproductivos de ovejas Rasa Aragonesa en pastoreo de alfalfa o esparceta durante la cubrición (junio-agosto 2014), y pesos vivos de su descendencia (enero 2015).

TABLE 2. Reproductive parameters of Rasa Aragonesa's ewes grazing alfalfa or sainfoin during mating (June-August 2014), and birth weight of their offspring (January 2015).

descendencia se muestran en la Tabla 2. La fertilidad de las ovejas en ambos lotes fue similar (90,5 %). La prolificidad de las ovejas que se cubrieron mientras pastaban alfalfa fue superior a la de las que pastaban esparceta ($P < 0,05$). La prolificidad se ha relacionado de manera positiva con el peso vivo y la condición corporal de las ovejas en el momento de la cubrición (Coop, 1962). Por lo tanto, las diferencias encontradas en este estudio podrían deberse al mayor peso vivo que presentaron las ovejas en alfalfa frente a las ovejas en esparceta durante la cubrición. La mayor prolificidad en ovejas pastoreando alfalfa durante la cubrición coincide con varios autores cuando la comparan con pastos senescentes (Robertson *et al.*, 2015) y una mayor tasa de ovulación cuando la comparan con praderas de *Phalaris aquatica* (King *et al.*, 2010). El mayor peso encontrado en los corderos al nacimiento ($P < 0,05$) de las ovejas cubiertas en pastoreo de esparceta podría deberse a la menor prolificidad de sus madres, ya que los corderos procedentes de partos simples presentan mayor peso frente a los partos múltiples (Quintero *et al.*, 1997; Macedo y Arredondo,

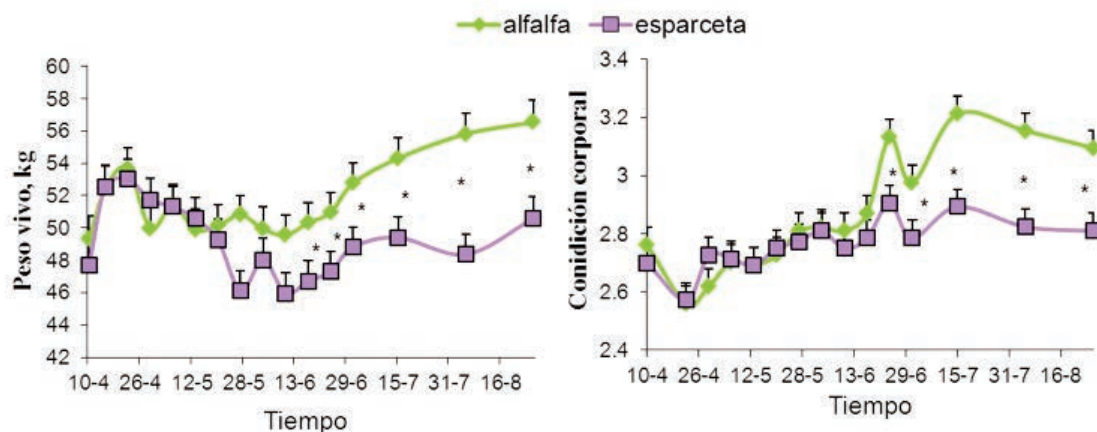


FIGURA 7. Evolución del peso vivo y de la condición corporal de las ovejas durante el periodo de pastoreo de alfalfa o esparceta (de abril a agosto). Diferencias entre forrajes en el mismo momento de aprovechamiento, * $P < 0,05$.

FIGURE 7. Evolution of live weight and body condition of sheep during the grazing period of alfalfa or sainfoin (from April to August). Differences between forages at the same time, * $P < 0.05$.

2008), y normalmente disminuye la mortalidad de corderos en el parto. En el presente ensayo sorprendió el desequilibrio observado en el ratio de hembras/machos, a favor de las hembras (57/43 y 72/28, para alfalfa y esparceta respectivamente). El ratio del sexo de la descendencia puede estar influido por la dieta recibida por la madre (Kent, 1995; Rosenfeld y Roberts, 2004), o por la condición corporal de la oveja en el momento de la cubrición, con un mayor porcentaje de hembras en ovejas con baja condición corporal (Clutton-Brock y Iason, 1986; Pergament *et al.*, 2002). Además de la condición corporal, otros factores como el estrés, el comportamiento sexual, los perfiles hormonales, el momento de la inseminación o cubrición pueden influir en el sexo de la descendencia. No se ha observado un efecto claro de la presencia de taninos condensados en concentración baja-moderada sobre los parámetros reproductivos. Sin embargo, hay estudios que muestran un efecto beneficioso de la presencia de taninos condensados sobre los parámetros reproductivos (Blache *et al.*, 2008). Varios estudios que valoraban el efecto del pastoreo de *Lotus corniculatus* frente al pastoreo de raigrás/trébol blanco durante la cubrición, observaron una mayor tasa de ovulación y prolificidad para el primer tipo de pasto (Min *et al.*, 2001; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Viñoles *et al.*, 2009). Es probable que también la estructura del tanino condensado, además de la cantidad de tanino condensado ingerida, influya en el efecto que éstos tienen sobre la reproducción.

CONCLUSIONES

La esparceta podría ser una buena alternativa forrajera a la alfalfa durante la lactación, ya que podría producir menos emisiones de metano y los resultados muestran una influencia positiva del pastoreo de esparceta sobre la ganancia media diaria de los corderos durante la lactación. Sin embargo, las ovejas del lote esparceta fueron perdiendo peso a lo largo del ensayo, pudiendo afectar a algunos parámetros reproductivos.

Será necesario confirmar estos resultados en estudios posteriores con un mayor número de animales y pesos similares al inicio de la cubrición.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean agradecer al personal del CITA, especialmente a I. Escota, F. Gracia, E. Echegoyen y M.A. Céspedes por su ayuda en el control de los animales. También desean agradecer a M.A. Legua y P. Eserverri su ayuda en los análisis químicos. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA-RTA-2012-080-00 e INIA-RZP-2013-00001-00-00. S. Lobón y P.J. Rufino disfrutaron de becas predoctorales del Gobierno de Aragón y de INIA, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- ABECIA J.A., SOSA C., FORCADA F., Y MEIKLE A. (2006) The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 367-378.
- AL-DOBAIB S. N. (2009) Effect of different levels of Quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. *Animal Science Journal*, 80(5), 532-541.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis, AOAC International, Maryland, U.S.A.
- BLACHE D., MALONEY S.K. Y REVELL D.K. (2008) Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 140-157.
- BLOOMFIELD F.H. (2011) Epigenetic modifications may play a role in the developmental consequences of early life events. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 3, 348-355.

- CLUTTON-BROCK T.H. Y IASON G.R. (1986) Sex ratio variation in mammals. *Quarterly Review of Biology*, 61, 339-374.
- COOP I. E. (1962) Liveweight-productivity relationships in sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 5(3-4), 249-264.
- DAWSON L.E.R., MCCOY M.A., EDGAR H.W.J. Y CARSON A.F. (2011) Effect of concentrate supplementation at pasture and inclusion of condensed tannins (Quebracho) in concentrates on lamb performance and faecal egg and worm counts. *Livestock Science*, 135(2-3), 205-214.
- DELGADO I., ANDRÉS C. Y MUÑOZ F. (2008) Effect of the environmental conditions on different morphological and agronomical characteristics of sainfoin. En: Porqueddu C. y Tavares de Sousa M.M. (Eds) *Sustainable Mediterranean grasslands and their multi-functions*, pp 199-202. Zaragoza: CIHEAM / FAO / ENMP / SPPF.
- EUROPEAN COMMUNITIES (1986) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, L358 (L358), 1-29.
- GRABBER J.H., ZELLER W.E. Y MUELLER-HARVEY I. (2013) Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in lotus species by the butanol-HCl-iron assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2669-2678.
- HATEW B., HAYOT CARBONERO C., STRINGANO E., SALES L.F., SMITH L.M.J., MUELLER-HARVEY I., HENDRIKS W.H. Y PELLIKAAN W.F. (2015) Diversity of condensed tannin structures affects rumen in vitro methane production in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) accessions. *Grass Forage Science*, 70, 474-490.
- JONES W.T., ANDERSON L.B. Y ROSS M.D. (1973) Bloat in cattle, XXXIX. Detection of protein precipitants (flavolans) in legumes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16, 441-446.
- KENT J.P. (1995) Birth sex ratios in sheep over nine lambing seasons: years 7-9 and the effects of ageing. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36, 101-104.
- KING B.J., ROBERTSON S.M., WILKINS J.F.Y FRIEND M.A. (2010) Short-term grazing of lucerne and chicory increases ovulation rate in synchronised Merino ewes. *Animal Reproduction Science*, 121(3-4), 242-248.
- KINGSTON-SMITH A.H., EDWARDS J.E., HUWS S.A., KIM E.J., Y ABBERTON M. (2010) Plant-based strategies towards minimising livestock's long shadow. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 613-620.
- LIVINGSTON A.L., SMITH D., CARNAHAN H.L., KNOWLES R.E., NELSON J.W. Y KOHLER G.O. (1968) Variation in the xanthophyll and carotene content of lucerne, clovers and grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19, 632-636.
- MACEDO R. Y ARREDONDO V. (2008) Effect of sex, type of birth and lactation on growth of pelibuey sheep under intensive management. *Archivos de Zootecnia*, 57, 219-228.
- MARTINIELLO P. (1998) Influence of agronomic factors on the relationship between forage production and seed yield in perennial forage grasses and legumes in a Mediterranean environment. *Agronomie*, 18, 591-601.
- MENKE K. H. Y STEINGASS H. (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- MIN B.R., BARRY T.N., ATTWOOD G.T. Y MCNABB W.C. (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 3-19.
- MIN B.R., FERNANDEZ J.M., BARRY T.N., MCNABB W.C. Y KEMP P.D. (2001) The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. *Animal Feed Science and Technology*, 92, 185-202.
- MIN B.R., PINCHAK W.E., ANDERSON R.C., FULFORD J.D. Y PUCHALA R. (2006) Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*, 84(9), 2546-2554.
- MOLAN A.L., WAGHORN G.C., MIN B.R. Y MCNABB W.C. (2000) The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitologica*, 47, 39-44.
- NIEZEN J.H., WAGHORN T.S., CHARLESTON W.A. Y WAGHORN G.C. (1995) Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science*, 125, 281-289.
- PEEL M.D., ASAY K.H., JOHNSON D.A. Y WALDRON B.L. (2004) Forage production of sainfoin across an irrigation gradient. *Crop Science*, 44, 614-619.
- PRACHE S. Y THERIEZ M. (1999) Traceability of lamb production systems: Carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science*, 69, 29-36.
- PERGAMENT E., TODYDEMIR P.B. Y FIDDLER M. (2002) Sex ratio: a biological perspective of 'Sex and the City'. *Reproductive biomedicine online*, 5, 43-46.
- QUINTERO A., BOSCAN J., PALOMARES R., GONZÁLEZ A. Y BOISSIERE J. (1997) Efecto del sexo sobre el peso corporal a diferentes edades en corderos West-African criados en el trópico venezolano. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 5, 426-427.
- RAMÍREZ-RESTREPO C.A. Y BARRY T.N. (2005) Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 179-201.
- RHIND S.M. (2004) Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 169-181.

- ROBERTSON S.M., CLAYTON E.H. Y FRIEND M.A. (2015) Reproductive performance of ewes grazing lucerne during different periods around mating. *Animal Reproduction Science*, 162, 62-72.
- ROSENFELD C.S. Y ROBERTS R.M. (2004) Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biology of Reproduction*, 71, 1063-1070.
- THEODORIDOU K., AUFRÈRE J., ANDUEZA D., LE MORVAN A., PICARD F., STRINGANO E., POURRAT J., MUELLER-HARVEY I. Y BAUMONT, R. (2011a) Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass Forage Science*, 66, 402-414.
- THEODORIDOU K., AUFRÈRE J., ANDUEZA D., POURRAT J., LE MORVAN A., STRINGANO E., MUELLER-HARVEY I. Y BAUMONT R. (2010) Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on in vivo and in situ digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 160, 23-38.
- THEODORIDOU K., AUFRÈRE J., NIDERKORN V., ANDUEZA D., LE MORVAN A., PICARD F. Y BAUMONT R. (2011b) In vitro study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles. *Animal Feed Science and Technology*, 170, 147-159.
- UDÉN P., ROBINSON P.H., MATEOS G.G. Y BLANK R. (2012) Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. *Animal Feed Science and Technology*, 171, 1-5.
- VAL J., MONGE E. Y BAKER N.R. (1994) An improved HPLC method for rapid analysis of the xanthophyll cycle pigments. *Journal of Chromatographic Science*, 32, 286-289.
- VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B. Y LEWIS B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74, 3583-3597.
- VIÑALES C., MEIKLE A. Y MARTIN G.B. (2009) Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 113, 82-92.
- WAGHORN G. (2008) Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 116-139.
- WAGHORN G.C., ULYATT M.J., JOHN, A. Y FISHER M.T. (1987) The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition*, 57(1), 115-126.
- WANG Y., WAGHORN G.C., MCNABB W.C., BARRY T.N., HEDLEY M.J. Y SHELTON I.D. (1996) Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *Journal of Agricultural Science*, 127(3), 413-421.



EL SORGO GRANO PARA ENSILAR EN GALICIA COMO NUEVA ALTERNATIVA AL MAÍZ FORRAJERO: PRODUCCIÓN Y CALIDAD NUTRITIVA EN SIEMBRAS TARDÍAS

María José Bande Castro*¹, César Resch Zafra¹ y Miguel Quintela García²

¹ Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo (CIAM). Instituto Galego de Calidade Alimentaria (INGACAL). Apartado 10, 15080 A Coruña (España).

² Progado S.L. Polígono Industrial de Sabón, Parcela 106 A, 15142 Arteixo, A Coruña (España).

GRAIN SORGHUM IN GALICIA FOR SILAGE AS A NEW ALTERNATIVE TO FORAGE MAIZE: YIELD AND NUTRITIVE VALUE IN LATE SOWING

Historial del artículo:

Recibido: 01/10/15

Revisado: 05/11/15

Aceptado: 25/01/16

Disponible online: 20/04/16

* Autor para correspondencia:

maribande@ciam.gal

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Palabras clave:

Rendimiento, composición química, cultivo de verano.

RESUMEN

El ensilado de sorgo puede ser una buena alternativa al del maíz para la alimentación de vacas de leche en áreas donde el riesgo de sequía estival sea alto. Con el propósito de determinar el potencial productivo del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) en las condiciones de secanos húmedos de la zona costera de Galicia, se evaluaron cinco variedades comerciales sembradas a mediados de junio como cultivo de verano. La cosecha se realizó en seis fechas diferentes, desde mediados de agosto hasta finales de octubre de 2012, a intervalos quincenales. La producción de materia seca (MS) por hectárea varió entre variedades en todos los cortes, oscilando en el último corte entre 4,6 y 8,4 t/ha de MS. Los contenidos en proteína bruta (PB) y fibra neutro detergente (FND) se vieron afectados por la variedad y el momento de corte. Promediando todas las variedades, los valores de PB variaron entre el 19,1 % (primer corte) y el 10,0 % (último corte) y los de FND entre el 53,8 % y 53,7 % respectivamente.

El segundo año se ensayaron las dos variedades que obtuvieron mejores resultados, 'Ascoli' y 'Alfa', con el objetivo de evaluar el rendimiento y la calidad del forraje. Con la variedad 'Ascoli' se obtuvo la mayor producción, los valores inferiores en el contenido en fibra ácido detergente, FND y carbohidratos solubles en agua, mientras que su contenido en almidón fue mayor. Las dos variedades estudiadas no mostraron diferencias significativas en cuanto a la digestibilidad in vivo e ingestibilidad.

Keywords:

Forage yield, chemical composition, summer crop.

ABSTRACT

Sorghum silage can be a good alternative to forage maize to feed dairy cows in areas where the risk of summer drought is high. Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) was tested to determine its yield under no irrigated conditions in temperate climate at Galician coastal area. Five different varieties were tested, which were sown at mid-June and harvested in six different dates since mid-August till late October every fifteen days. Dry matter (DM) yield per hectare in the last cut was between 4.6 and 8.4 t DM/ha. Crude protein (CP) and neutral detergent fibre (NDF) contents differed depending on variety and harvest date. Mean CP content varied from 19.1 % at first harvest to 10.0 % at the last one, while NDF content varied between 53.8 % and 53.7 % at first and last cut.

In the following year, two varieties with the highest DM yields were selected, so "Ascoli" and "Alfa" were sown to test their yield and forage quality. The variety "Ascoli" showed better results in terms of DM yield per hectare, lower contents in NDF, acid detergent fibre and water soluble carbohydrates, and higher starch percentage. "In vivo" trials were made with both varieties and no significant difference in terms of DM digestibility and intake were found. Both varieties showed a good performance as fodder for dairy cattle.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el desarrollo del sector productor de vacuno de leche en Galicia se ha caracterizado por la concentración de la producción en un menor número de comarcas y explotaciones, cada vez más especializadas. La evolución del modelo productivo lácteo gallego en los últimos años ha estado marcada por un incremento de la dependencia del suministro de insumos alimentarios del exterior, atenuada por una mayor intensificación forrajera de la Superficie Agraria Útil (SAU) disponible, por la mejora genética del ganado vacuno lechero y por un manejo más eficiente en la gestión de la explotación (Flores *et al.*, 2011).

El principal cultivo de verano elegido para ensilado en las explotaciones lecheras de Galicia durante mucho tiempo ha sido el maíz forrajero (*Zea mays* L.); así los datos obtenidos por Fernández-Lorenzo *et al.* (2009) muestran que la intensificación productiva de las explotaciones gallegas se vio acompañada de una mayor ocupación de la SAU por el cultivo del maíz forrajero para ensilar. Sin embargo, para que el maíz tenga un alto valor nutricional debe producir grandes cantidades de grano y, en períodos de sequía, la producción de grano puede ser muy limitada (Bean y Marsalis, 2012). Dada su mayor tolerancia a la sequía y mejor adaptación a suelos con menor fertilidad, el sorgo grano y forrajero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) se presenta como una buena alternativa al maíz forrajero para la obtención de una cosecha en muchas zonas de Galicia. De hecho, por ejemplo, en el norte de Italia hace años que se estudia la posibilidad y conveniencia de sustituir total o parcialmente el maíz ensilado por otros forrajes (Colombo *et al.*, 2007; Colombini *et al.*, 2012).

Por otro lado, la nueva reforma de la Política Agraria Común (PAC), cuya aplicación comenzó en 2015, contempla la posibilidad de que las explotaciones obtengan un pago por prácticas agrícolas beneficiosas para el clima y el medio ambiente (pago verde o 'greening'), condicionando la subvención a la diversificación de cultivos. En Galicia, la aplicación de la diversificación de cultivos en el período de primavera (entre mayo y septiembre) supone en la práctica una reducción de la superficie de maíz en parte de las explotaciones lecheras. Esa reducción generará una pérdida media estimada de 187 €/ha en estas explotaciones (G. Flores, comunicación personal). El pago verde exige sembrar, al menos, dos cultivos diferentes cuando la tierra de cultivo de la explotación cubra entre 10 y 30 ha -tres cultivos si cubre más de 30 ha-, sin que ninguno de ellos supere el 75 % de la superficie y en el caso de tres cultivos, dos de ellos en conjunto no podrán sobrepasar el 95 %. Se exige que el cultivo se encuentre en el recinto durante dos meses consecutivos de los indicados. Quedan exentas las explotaciones que tengan las tres cuartas partes de sus tierras con praderas (unas 35 000), pero unas 3 000 explotaciones gallegas se verán obligadas a cambios en el manejo de sus



© María J. Bande Castro

Planta de sorgo un mes después de la siembra (capacidad de ahijado).
Sorghum plant one month after seeding (tillering capacity).

cultivos introduciendo nuevos cultivos forrajeros, como puede ser el girasol (*Helianthus annuus* L.), el sorgo, etc. Esos productores se corresponden fundamentalmente con las explotaciones lácteas más dimensionadas, que en Galicia practican en primavera-verano un monocultivo de maíz, ya que es el forraje que permite obtener más volumen de producción y, así, reducir en mayor medida las compras externas de alimento para los animales. Por lo tanto, el sorgo puede ser un cultivo de verano fundamental para cumplir dicha diversificación y convertirse en una alternativa para mejorar los ingresos de los agricultores.

El término "sorgo" engloba a un conjunto de plantas pertenecientes todas ellas a la familia de las gramíneas y al género *Sorghum*, entre las que cabe citar esencialmente a los sorgos para grano (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) y a los pastos del Sudán (*Sorghum sudanense* Piper), o a posibles híbridos intra o interespecíficos. Tanto el sorgo grano como el forrajero han sido mejorados genéticamente, incrementando la calidad de forraje y/o grano, y la productividad de materia seca (MS) por hectárea. De esta forma se han desarrollado distintos tipos adaptados a las necesidades de manejo de la producción animal, al incorporarse características como nevadura marrón (bmr) -menor contenido de lignina-, contenido de azúcar en tallo, fotosensibles -ciclo vegetativo de mayor longitud-, resistencia al vuelco, tolerancia a factores edafoclimáticos limitantes, etc. De acuerdo a lo mencionado, estos cultivares



Panojas de Ascoli y Alfa en el momento de la cosecha.



Sorghum cobs of Ascoli and Alfa varieties at harvesting time.

© César Resch Zafra

podrían agruparse en: sorgo granífero doble propósito, pastos del Sudán, híbridos de sorgo x pastos del Sudán, sorgo de nevadura marrón o 'bmr', sorgo fotosensible y sorgo azucarado (sileros, "alcoholeros"). Los sorgos denominados sileros son generalmente híbridos graníferos de alto potencial de rendimiento y productividad de biomasa (granífero doble propósito), de ciclo intermedio a largo, de alta producción de MS y digestibilidad, usados en ensilado de planta entera, con distinto contenido de azúcar en tallo o sin él, con o sin la característica de nevadura marrón (menor lignina) y granos con o sin taninos condensados, buscando una alta proporción de panoja (almidón). En España, según el MAGRAMA (2015), se destinan al cultivo de sorgo para forraje sólo 2 417 ha, de las que un 57 % se concentran en Cataluña; mientras que en Galicia, por el momento, su cultivo es testimonial.

La capacidad productiva del sorgo es mucho menor que la del maíz, y desde el punto de vista de su valor nutritivo, el sorgo es un alimento menos energético que el maíz. Aún así, Lusk *et al.* (1984), Grant *et al.* (1995) y Oliver *et al.* (2004) no encontraron diferencias significativas en la digestibilidad y en la producción de leche entre vacas alimentadas con ensilados de sorgo, principalmente 'bmr', y de maíz forrajeros. Estudios recientes realizados por Colombini *et al.* (2012) también demostraron que, proporcionando una adecuada suplementación de almidón, la planta entera de sorgo grano ensilado puede reemplazar al ensilado de maíz en vacas lecheras sin ningún efecto negativo sobre la producción de leche.

En el mercado se dispone de un gran número de variedades de sorgo, haciendo difícil seleccionar las más adecuadas para la producción de forraje para ensilar sin conocer su comportamiento en una zona concreta. Además, el tiempo de crecimiento y la etapa de madurez en la cosecha afectan en gran medida al rendimiento del forraje (Åman y Graham, 1987).

Los objetivos planteados en este trabajo se estructuraron en dos ensayos. En un primer ensayo se evaluó la adaptación del sorgo como productor de forraje en siembras tardías en cultivo de secano en la zona costera de Galicia, buscando conocer, en esas condiciones, la producción de forraje de diferentes variedades comerciales de sorgo grano y forrajero, así como los genotipos para ensilar en un único corte con alta proporción de grano (estado pastoso). Para ello se evaluó la evolución de la producción y del contenido de proteína bruta (PB) y fibra neutro detergente (FND) en las diferentes etapas del desarrollo del cultivo. En un segundo ensayo se evaluó con mayor detalle el rendimiento y la calidad forrajera de las dos variedades de sorgo grano consideradas más apropiadas según la evaluación realizada en el ensayo anterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

El primer ensayo se realizó durante el período comprendido entre mediados de junio y finales de octubre de 2012, en la finca del CIAM (A Coruña), zona costera de clima atlántico a 100 m

de altitud, en condiciones de secano. El cultivo precedente fue una pradera y los valores de fertilidad del suelo eran: saturación de aluminio de 21,8 %, contenido en fósforo (Olsen) de 20 ppm y contenido en potasio (acetato amónico) de 211 ppm. La temperatura media durante el período de cultivo fue de 17,0 °C y la precipitación total acumulada de 186 L/m². El ensayo se llevó a cabo sobre suelos cuyo material de partida son esquistos pelíticos de la serie Betanzos-Arzúa de la formación conocida como "Complejo de Órdenes" (Martínez *et al.*, 1984). Son suelos profundos, sin pedregosidad en el perfil y de pH ácido. La textura del horizonte superficial del suelo es franca a franco-limosa y el contenido en materia orgánica medio.

Las cinco variedades comerciales de sorgo grano y forrajero evaluadas fueron: 'Ascoli', 'PR849F', 'Express', 'Alfa' y 'PR88Y20'. El laboreo consistió en el alzado del suelo con arado de vertedera, seguido de un pase de grada rotativa vertical. Posteriormente se aplicó una fertilización de 120 kg/ha de nitrógeno, 120 kg/ha de P₂O₅ y 220 kg/ha de K₂O aplicada en fondo en forma del complejo 15-15-15 y de cloruro potásico, y 69 kg/ha de nitrógeno en cobertera en forma de urea cuando las plantas tenían una altura de 50 cm.

El diseño seguido fue de parcelas divididas (split-plot), con la variedad como parcela principal y la fecha de corte como sub-parcela, con cuatro repeticiones de cada fecha de corte por parcela principal. La parcela elemental la constituyen cuatro líneas de cultivo de 18 m de longitud separadas 0,75 m (54 m²). La siembra de todas las variedades se realizó el 19 de junio de 2012 con una sembradora neumática de precisión y con una densidad aproximada de 155 000 semillas/ha. La siembra se retrasó notablemente respecto al periodo recomendable, que es la segunda quincena de mayo. Para el control de malas hierbas se aplicó en preemergencia un herbicida comercial (Harness GTZ; actualmente retirado del mercado) con acetocloro y terbutilazina como materias activas, y a una dosis de 4 L/ha. Asimismo se aplicó un insecticida a base de clorpirifos al 48% (Pyrgos) a una dosis de 1 L/ha.

Los controles de producción se realizaron en seis fechas diferentes, desde mediados de agosto hasta finales de octubre de 2012, a intervalos quincenales. En cada fecha se cosecharon los 18 m de las dos líneas centrales de cada parcela elemental (parcela útil = 27 m²), cortando la oferta de forraje a 8 cm del nivel del suelo con una cosechadora picadora de forraje Wintersteiger Cibus S. La muestra fue pesada directamente en fresco en el campo por la cosechadora y, por cuarteos sucesivos, se tomó una alícuota de aproximadamente 1 000 g, que se envió al laboratorio para la determinación de MS en estufa de aire forzado Unitherm, a 80°C durante 16 h (Castro, 1996). Posteriormente se molieron las muestras a 1 mm en molino de martillos Christy and Norris para la realización de las restantes determinaciones por vía húmeda. Se determinó el contenido de PB, expresada como nitrógeno (N) total x 6,25, mediante digestión micro Kjeldahl, seguida de la

determinación colorimétrica del ión amonio, según el método descrito por Castro *et al.* (1990), adaptando al autoanalizador de flujo continuo AAIII (Bran-Luebbe, Inc., Technicon Industrial Systems Corp., Tarrytown, NY, EEUU). La FND se determinó según Goering y Van Soest (1970), y mediante un digestor Fibertec (Foss Tecator AB, Suecia) según Castro (2000).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza, introduciendo los factores Variedad, Fecha de corte y la interacción Variedad x Fecha de corte para todas las variables dependientes (%MS, producción, PB y FND), utilizando el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS v.8a (SAS Institute, 2000). La separación de medias se realizó mediante el test de diferencias mínimas significativas (*d.m.s.*) al nivel de probabilidad de $p < 0,05$.

El segundo ensayo se realizó durante el año 2013, en la finca del CIAM (A Coruña), en condiciones de secano. El cultivo precedente fue una mezcla de raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) con leguminosas anuales. Las características de fertilidad del suelo eran: saturación de aluminio de 20,9%, contenido en fósforo (Olsen) de 22 ppm y contenido en potasio (acetato amónico) de 214 ppm, con un pH de 5,3. Son suelos profundos y sin pedregosidad en el perfil. La temperatura media durante el período de cultivo fue de 18,5°C y la precipitación total acumulada de 147 L/m², concentrada en 27 días (el 75 % en 15 días en el último mes).

Las dos variedades escogidas ('Ascoli' y 'Alfa') para realizar el ensayo fueron las que mostraron mejores resultados en el ensayo anterior. El diseño experimental fue de bloques al azar con ocho bloques y dos tratamientos (dos variedades), es decir, 16 parcelas elementales. La parcela elemental consistió en 16 líneas de cultivo de 20 m de longitud separadas 0,75 m (240 m²).

El laboreo consistió en el alzado del suelo con arado de vertedera seguido de dos pases cruzados de grada de discos. A continuación se aportó una fertilización de 120 kg/ha de N, 120 kg/ha de P₂O₅ y 250 kg/ha de K₂O aplicada en fondo en forma del complejo 15-15-15 y cloruro potásico, y 69 kg/ha de N en cobertera. La siembra se realizó el 25 de junio con una dosis de siembra de 217 000 semillas/ha.

El 21 de octubre se cosecharon los 18 m centrales (94,5 m²) de las ocho líneas centrales de cada parcela elemental, cortando a 8 cm del suelo con una cosechadora picadora de forraje Wintersteiger Cibus S. El estado fenológico de las plantas era de grano pastoso y/o lechoso-pastoso (momento óptimo de cosecha para ensilar, correspondiente a un contenido en MS de la planta entera del orden del 28-30 %). La muestra fue pesada directamente en campo por la cosechadora y, por cuarteos sucesivos, se tomó una alícuota de 1 000 g aproximadamente, que se envió al laboratorio para las diferentes determinaciones.

Para calcular la producción de forraje se determinó la MS de la misma forma que en el ensayo anterior. Posteriormente, se molieron las muestras a 1 mm en molino de martillos Christy and Norris para la realización de las restantes determinaciones por vía húmeda. Se determinaron los contenidos de PB y FND tal y como se describió anteriormente, el de fibra ácido detergente (FAD) según Goering y Van Soest (1970), determinada en un digestor Fibertec (Foss Tecator AB, Suecia), y el de carbohidratos no estructurales (CNET) y solubles en agua (CSA) según Castro (2000). El almidón se determinó mediante el método polarimétrico. Todos los parámetros se refirieron a MS. La digestibilidad de la materia seca (DMS) y la ingestibilidad (IMS) se midieron utilizando seis carneros castrados por cada variedad que se quería experimentar. Para ello, siguiendo la metodología descrita por Flores (2004), los animales se confinaron en jaulas metabólicas diseñadas para tal efecto y durante once días seguidos se les ofertó alimento ad libitum, se tomó el peso de alimento ofrecido y rechazado y el peso de heces excretadas, y después se determinó mediante las fórmulas correspondientes la DMS y la IMS del alimento. Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Pastos y Forrajes del CIAM. Las fórmulas utilizadas para el cálculo de la DMS y la estimación de la IMS fueron:

$$\text{DMS (\%)} = [(\text{MS ingerida} - \text{MS excretada}) / \text{MS ingerida}] \times 100$$

$$\text{MS ingerida} = \text{MS ofrecida} - \text{MS rechazada}$$

$$\text{IMS (g MS kg PV}^{-0,75} \text{ día}^{-1}) = \text{MS ingerida} / (\text{Peso vivo})^{0,75}$$

El análisis estadístico consistió en un anova simple de una vía con el factor Variedad y $n=8$ y una separación de medias que se efectuó mediante el test de diferencias mínimas significativas (*d.m.s.*), utilizando el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS v.8a (SAS Institute, 2000). En el caso de la DMS y la IMS se analizaron de la misma manera, con $n=6$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer ensayo

La nascencia del cultivo fue lenta, escalonada y poco uniforme debido a que las temperaturas durante el primer mes fueron bajas (Tabla 1), lo que llevó aparejado una ralentización del desarrollo vegetativo y un alargamiento del ciclo. Concretamente las temperaturas mínimas de los días siguientes a la siembra estuvieron por debajo de los 10°C (21, 22, 23 y 24 de junio con

temperaturas de 9,4; 6,7; 6,3 y 8,3°C respectivamente), temperaturas inferiores a la de umbral de crecimiento del cultivo. El 26 de junio el porcentaje de emergencia fue del 5% y el 2 de julio del 30%, alcanzando el 1 de agosto el estado de seis hojas con una altura de 50 cm.

En su posterior desarrollo no se observaron problemas fitopatológicos, por lo que no fue necesario realizar ningún tratamiento fitosanitario adicional, no apreciándose además ninguna incidencia que pudiese afectar su correcto rendimiento.

El primer aprovechamiento se llevó a cabo el 13 de agosto, a los 55 días de la siembra. En este período la temperatura media fue de 17,7°C. La temperatura acumulada desde la siembra fue de 425,3°C x día acumulados (sobre una temperatura base de 10°C) y la precipitación acumulada de 27,4 L/m² (Tabla 2). El estado fenológico de la planta era de ocho hojas, sin inicio de la emisión de la panícula en ninguna de las variedades.

Promediando todas las variedades, el contenido en MS (Tabla 3) varió de 17,9% en el primer corte hasta 29,5% en el último corte ($p<0,001$). Comparando las diferentes variedades ensayadas para el conjunto de las seis fechas de corte, el mayor incremento en contenido en MS lo experimentó la variedad 'Ascoli', alcanzando en la última fecha un 32,0%, lo que estaría relacionado con que se trata de la variedad más precoz. La variedad 'PR849F', la única evaluada con aptitud forrajera, presenta en la última fecha el menor contenido en MS, debido a que tiene un ciclo largo y una mayor proporción de parte verde.

En la última fecha de corte todas las variedades alcanzaron el máximo de producción en el período analizado (Tabla 4). La variedad 'PR849F' mostró la producción más elevada, con 8420 kg/ha de MS, seguida de 'Alfa' (8170 kg/ha de MS) y 'Ascoli' (7978 kg/ha de MS), no existiendo diferencias significativas entre ellas.

A partir del corte realizado el 17 de septiembre se hizo evidente un aumento en la producción de MS de las variedades 'PR849F' y 'Alfa' respecto a las demás variedades evaluadas, y a partir del 1 de octubre, el incremento de producción de 'Ascoli' fue superior al resto, obteniéndose una producción final similar a las de 'PR849F' y 'Alfa'.

La mayor producción obtenida por la variedad 'PR849F' en la última fecha de cosecha se atribuiría a su aptitud forrajera,

Mes	2012					Media de los últimos 10 años			
	Precipitación L/m ²	Días de lluvia	Tª media °C	Tª media máximas °C	Tª media mínimas °C	Precipitación L/m ²	Tª media °C	Tª media máximas °C	Tª media mínimas °C
Junio	64,4	4	16,9	21,6	11,7	47,4	17,3	22,5	11,9
Julio	10,1	7	17,7	23,0	11,9	40,6	18,4	23,6	12,8
Agosto	26,8	8	18,7	24,6	13,2	37,5	18,7	24,5	12,9
Septiembre	30,9	4	17,6	25,0	10,7	40,5	17,3	24,0	11,2
Octubre	54,2	18	14,4	19,6	9,4	181,8	14,7	20,3	9,7

TABLA 1. Precipitación y temperaturas durante los meses del ensayo.

TABLE 1. Precipitation and temperatures during the months of the trial.

debido a que alcanza mayor altura, en concordancia con los resultados de Schmid *et al.* (1976) y González Torrealba *et al.* (2005), quienes encontraron que la altura de la planta esta correlacionada positivamente con la producción en MS.

Fecha de corte	Tª media °C	Precipitación acumulada L/m²	Grados-día acumulados °C
13 agosto	17,7	27,4	425,3
27 agosto	18,1	44,1	560,8
17 septiembre	18,2	49,2	738,5
1 octubre	17,9	80,1	826,7
15 octubre	17,8	104,4	915,6
29 octubre	17,3	133,6	965,3

TABLA 2. Temperatura media, precipitación y grados-día acumulados entre fechas de cortes.

TABLE 2. Mean temperature, accumulated precipitation and degree-days between cutting dates.

Variedad	Fecha de corte						Media de la variedad
	13 agosto	27 agosto	17 septiembre	1 octubre	15 octubre	29 octubre	
Ascoli	17,7 ab	17,3 a	24,3 a	25,0 a	26,6 a	32,0 a	23,8 a
PR849F	17,4 ab	14,2 b	18,3 c	20,4 b	21,4 b	24,9 c	19,4 c
Express	19,2 a	17,3 a	22,7 b	21,9 ab	25,5 a	31,1 ab	23,0 ab
Alfa	16,7 b	16,6 a	22,7 b	23,9 a	24,7 a	28,8 b	22,2 b
PR88Y20	18,7 ab	17,5 a	23,8 a	25,2 a	23,9 ab	30,5 ab	23,3 a
Media del corte	17,9 d	16,6 e	22,4 c	23,3 b	24,4 b	29,5 a	

d.m.s.: variedad x fecha de corte: 1,0.

p variedad:***, p fecha de corte:***, p variedad x fecha de corte:*

d.m.s.: diferencia mínima significativa entre dos medias de la misma columna o fila al nivel $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$. Las cifras seguidas de la misma letra dentro de cada columna (distintas variedades) no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las cifras seguidas de la misma letra dentro de la última fila no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

TABLA 3. Contenido en materia seca (%) para las distintas variedades de sorgo y fechas de corte.

TABLE 3. Dry matter content (%) for different sorghum varieties and harvest dates.

Variedad	Fecha de corte						Media de la variedad
	13 agosto	27 agosto	17 septiembre	1 octubre	15 octubre	29 octubre	
Ascoli	517 a	1774 a	4699 a	5153 b	6390 ab	7978 a	4419 b
PR849F	381 a	1699 a	4959 a	6574 a	7126 a	8420 a	4860 a
Express	111 b	815 b	3166 b	3083 c	4255 c	4575 b	2667 d
Alfa	591 a	2012 a	5262 a	6020 ab	7236 a	8170 a	4882 a
PR88Y20	387 a	1433 ab	3990 ab	4667 b	4691 bc	5674 b	3474 c
Media del corte	397 f	1547 e	4415 d	5099 c	5940 b	6963 a	

d.m.s.: variedad x fecha de corte: 523.

p variedad:***, p fecha de corte:***, p variedad x fecha de corte:***

d.m.s.: diferencia mínima significativa entre dos medias de la misma columna o fila al nivel $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. Las cifras seguidas de la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las cifras seguidas de la misma letra dentro de la última fila no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

TABLA 4. Producción de materia seca total (kg MS/ha) para las distintas variedades de sorgo y fechas de corte.

TABLE 4. Dry matter yield (kg DM/ha) for different sorghum varieties and harvest dates.

Variedad	Fecha de corte						Media de la variedad
	13 agosto	27 agosto	17 septiembre	1 octubre	15 octubre	29 octubre	
Ascoli	18,1 c	17,1 bc	9,0 b	9,8 ab	10,1 a	10,6 a	12,4 b
PR849F	20,0 a	16,6 c	9,3 b	8,5 c	8,2 c	8,7 c	11,9 c
Express	19,9 a	18,5 a	10,5 a	10,4 a	10,0 a	10,6 a	13,3 a
Alfa	19,2 b	16,8 c	9,5 b	9,4 abc	9,1 b	9,7 b	12,3 bc
PR88Y20	18,1 c	18,0 ab	9,6 ab	9,3 bc	9,6 a	10,4 ab	12,5 b
Media del corte	19,1 a	17,4 b	9,6 cd	9,5 d	9,4 d	10,0 c	

d.m.s.: variedad x fecha de corte: 0,4.

p variedad:***, p fecha de corte:***, p variedad x fecha de corte:***

d.m.s.: diferencia mínima significativa entre dos medias de la misma columna o fila al nivel $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. Las cifras seguidas de la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las cifras seguidas de la misma letra dentro de la última fila no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

TABLA 5. Contenido en proteína bruta (% sobre materia seca) para las distintas variedades de sorgo y fechas de corte.

TABLE 5. Crude protein content (% on dry matter) for different sorghum varieties and harvest dates.

podría atribuirse a que presenta una mayor producción de MS debido a su elevada altura (Tabla 4), aumentando la proporción de tallo respecto a hojas, lo que conlleva una merma en la calidad nutritiva con el valor mínimo de PB.

El contenido en FND (Tabla 6) aumentó hasta la tercera fecha de cosecha (17 de septiembre), llegando a valores que variaron desde 63,1 % ('Express') hasta 65,0 % ('PR88Y20'); a partir de este momento, los contenidos de FND de todas las variedades, excepto 'PR849F', mostraron una fuerte caída hasta la quinta fecha de cosecha (15 de octubre), en la que se alcanzaron valores de 50,4 %, 50,6 %, 52,0 % y 52,1 % para 'Ascoli', 'PR88Y20', 'Express' y 'Alfa', respectivamente. Este fenómeno puede atribuirse a la acumulación de carbohidratos de reserva en los granos, produciéndose un efecto de dilución de las paredes celulares en el resto de componentes de la planta. La variedad 'PR849F' caracterizada por una panícula poco densa y con apenas formación de granos, no mostró este fenómeno de forma tan acusada como las otras variedades; de hecho, en la última fecha de cosecha fue la variedad que alcanzó el mayor contenido de FND (59,5 %) debido al aumento en la proporción de tallo, implicando una merma en la calidad nutritiva.

Segundo ensayo

El mayor rendimiento obtenido con la variedad 'Ascoli' (Tabla 7) podría deberse a su estado fenológico más avanzado. En cuanto a la composición del forraje, 'Ascoli' mostró valores inferiores a 'Alfa' en FAD, FND, CSA y CNET, y superiores en almidón. Estas diferencias pueden deberse al

estado de desarrollo de las plantas en el momento de la cosecha, estando la variedad 'Ascoli' más adelantada; pues cosechar en un estado más avanzado de crecimiento de la planta implica una disminución en los contenidos de FND y CSA, lo que se atribuye a que el grano se llena con almidón (Ashbell y Weinberg, 2001). Asimismo, el estudio de Gontijo Neto et al. (2002) reveló diferencias en cuanto a valores de proteína y fibra probablemente atribuidas también al estado de madurez de la planta.

Por último, no se observaron diferencias significativas entre las dos variedades en digestibilidad *in vivo* ni en ingestibilidad (Tabla 8).

Los resultados obtenidos en estos ensayos coinciden, en general, con los encontrados en la bibliografía en cuanto a la buena calidad nutricional que presenta el sorgo como alternativa al maíz (Colombo et al., 2007).

CONCLUSIONES

En las condiciones ambientales y de manejo en las que se llevó a cabo el primer ensayo, la última fecha de cosecha sería la más adecuada para conciliar una buena producción de MS y una aceptable calidad nutritiva para el aprovechamiento del sorgo como ensilado. Para este tipo de aprovechamiento no se recomendaría el uso de la variedad 'PR849F' debido a que los valores de composición química son menos adecuados que los de las demás variedades. Si además tenemos en cuenta los resultados de los

Variedad	Fecha de corte						Media de la variedad
	13 agosto	27 agosto	17 septiembre	1 octubre	15 octubre	29 octubre	
Ascoli	51,9 b	55,9 ab	64,2 a	55,9 c	50,4 b	54,3 b	55,4 bc
PR849F	53,9 a	56,6 a	63,9 a	61,3 a	60,4 a	59,5 a	59,3 a
Express	52,8 b	54,2 b	63,1 a	57,6 b	52,0 b	50,8 c	55,1 c
Alfa	54,9 a	56,8 a	64,7 a	58,6 b	52,1 b	52,8 bc	56,7 b
PR88Y20	55,4 a	56,2 a	65,0 a	58,2 b	50,6 b	51,3 c	56,1 b
Media del corte	53,8 d	55,9 c	64,2 a	58,3 b	53,1 d	53,7 d	

d.m.s.: variedad x fecha de corte: 1,2.

p variedad:***, p fecha de corte:***, p variedad x fecha de corte:***

d.m.s.: diferencia mínima significativa entre dos medias de la misma columna o fila al nivel $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. Las cifras seguidas de la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las cifras seguidas de la misma letra dentro de la última fila no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

TABLA 6. Contenido en fibra neutro detergente (% sobre materia seca) para las distintas variedades de sorgo y fechas de corte.

Variedad	Producción (kg MS/ha)	PB	FAD	FND	CSA	CNET	Almidón
Ascoli	8782 a	10,7 a	23,3 b	45,6 b	3,7 b	16,3 b	31,0 a
Alfa	7101 b	11,2 a	27,7 a	52,7 a	9,7 a	21,9 a	15,9 b
d.m.s.	909	1,4	3,4	4,3	2,4	4,9	12,9
p	**	n.s.	*	*	**	*	*

PB: proteína bruta (%MS); FAD: fibra ácido detergente (%MS); FND: fibra neutro detergente (%MS); CSA: carbohidratos solubles en agua (%MS); CNET: carbohidratos no estructurales totales (%MS); almidón (%MS);

d.m.s.: diferencia mínima significativa entre dos medias de la misma columna al nivel $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$. Las cifras seguidas de la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

TABLA 7. Rendimiento y calidad para las dos variedades de sorgo.

TABLA 7. Dry matter yield and quality for the two sorghum varieties.

TABLA 6. Neutral detergent fibre content (% on dry matter) for different sorghum varieties and harvest dates.

Variedad	DMS (%)	IMS (g MS kg PV ^{-0,75} día ⁻¹)
Ascoli	58,9	51,2
Alfa	62,0	55,3
Media	60,4	53,3
d.m.s.	3,6	19,5
p	n.s.	n.s.

d.m.s.: diferencia mínima significativa entre dos medias de la misma columna al nivel $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,05$.

TABLA 8. Digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS) e ingestibilidad de la materia seca (IMS) de las dos variedades de sorgo forrajero ensayadas.

TABLA 8. *In vivo* dry matter digestibility (DMS) and dry matter ingestibility (IMS) of the two forage sorghum varieties tested.

rendimientos, se recomiendan las variedades 'Ascoli' y 'Alfa' como las más apropiadas para el cultivo del sorgo forrajero en siembras tardías en la Galicia atlántica.

En cuanto al segundo ensayo, con la variedad 'Ascoli' se obtuvo un mayor rendimiento que con 'Alfa'. La primera también mostró valores inferiores en el contenido en FAD, FND y CSA, mientras que en almidón su contenido fue mayor. Las dos variedades estudiadas no mostraron diferencias significativas en cuanto a la digestibilidad *in vivo* e ingestibilidad.

Desde el punto de vista de las necesidades nutricionales de vacas de leche, se concluye que los valores encontrados en ambas variedades podrían sustituir a un ensilado de maíz (NRC, 2001); lo que permitirá que el sorgo sea una buena opción en determinadas zonas con condiciones edáficas y/o climáticas limitantes donde el maíz no responde y/o sea usado para cumplir la diversificación de cultivos de la PAC. Sin embargo, es indispensable la realización de experiencias locales, ya que la cantidad y la calidad del forraje depende del cultivar utilizado, el ambiente y el estado de madurez en que se coseche, siendo necesario un mayor conocimiento de las características del cultivo y el potencial que ofrecen distintos cultivares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a las ayudas recibidas a través del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) de la Consellería de Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia con el proyecto titulado "Alternativas de cultivos para mitigar los efectos del cambio climático: evaluación de cultivos resistentes a seca para la producción de forraje en explotaciones de leche".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÂMAN P. Y GRAHAM H. (1987) Whole-crop peas. I. Changes in botanical and chemical composition and rumen *in vitro* degradability during maturation. *Animal Feed Science and Technology*, 17, 15-31.
- ASHBELL G. Y WEINBERG Z.G. (2001) Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. En: Mannetje L.'t (ed) *Estudio FAO producción y protección vegetal*, 161, pp. 111-120. Roma, Italia: FAO.
- BEAN B. Y MARSALIS M. (2012) Corn and sorghum silage production considerations. High Plains Dairy Conference. Amarillo, TX, EEUU: A&M AgriLife Research and Extension.
- CASTRO P. (1996) Efecto de tres temperaturas de secado sobre la calidad de forrajes y heces. En: *Actas de la XXXVI Reunión Científica de la SEEP*, pp. 365-368. La Rioja, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- CASTRO P. (2000) Determinación de carbohidratos no estructurales en forrajes. En: *III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*, pp. 447-453. Santiago de Compostela, España: Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria, Xunta de Galicia.
- CASTRO P., GONZÁLEZ-QUINTELA A. Y PRADA-RODRÍGUEZ D. (1990) Determinación simultánea de nitrógeno y fósforo en muestras de pradera. En: *XXX Reunión Científica de la SEEP*, pp. 200-207. San Sebastián, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- COLOMBINI S., GALASSI G., CROVETTO G.M. Y RAPETTI L. (2012) Milk production, nitrogen balance, and fiber digestibility prediction of corn, whole plant grain sorghum, and forage sorghum silages in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 95, 4457-4467.
- COLOMBO D., CROVETTO G.M., COLOMBINI S., GALASSI G. Y RAPETTI L. (2007) Nutritive value of different hybrids of sorghum forage determined *in vitro*. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 289-291.
- FERNÁNDEZ-LORENZO B., DAGNAC T., GONZÁLEZ-ARRÁEZ A., VALLADARES J., PEREIRA-CRESPO S. Y FLORES G. (2009) Sistema de rendimiento de leche en Galicia. Evolución y estado actual. *Pastos*, 39 (2), 251-294.
- FLORES G. (2004) Factores que afectan a la calidad del ensilaje de hierba y a la planta de maíz forrajero en Galicia y evaluación de métodos de laboratorio para la predicción de la digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica de estos forrajes ensilados. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid.
- FLORES G., FERNÁNDEZ-LORENZO B. Y RESCH C. (2011) Aumentar la base forrajera de las explotaciones lecheras, clave para garantizar su futuro. *Vida Rural*, 322, 27-32.
- GOERING H. Y VAN SOEST P. (1970) Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agriculture Handbook*, 379, 20 pp. Washington D.C., EEUU: ARS, USDA.
- GONTIJO NETO M.M., OBEID J.A., PEREIRA O.G., CECILION P.R., CÂNDIDO M.J.D. Y MIRANDA L.F. 2002. Híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivados sob níveis crescentes de adubação. Rendimento, proteína bruta e digestibilidade *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31 (4), 1640-1647.
- GONZÁLEZ TORREALBA R.O., SEQUERA MIRELLIY W.Y. Y GRATEROL Y. (2005) Comportamiento de nueve cultivares de sorgo forrajero en Portuguesa, Venezuela. *Pastos*, 35 (2), 151-162.
- GRANT R.J., HADDAD S.G., MOORE K.J. Y PEDERSEN J.F. (1995) Brown midrib sorghum silage for midlactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78, 1970-1980.
- LUSK J.W., KARAU P.K., BALOGU D.O. Y GOURLEY L.M. (1984) Brown midrib sorghum or corn silage for milk production. *Journal of Dairy Science*, 67, 1739-1744.
- MAGRAMA (2015) *Anuario de Estadística. Avance 2014*. Disponible en:

- http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2014-Avance/AE_2014_Avance.pdf [Consulta: 19 de junio de 2015]
- MARTÍNEZ J.R., KLEIN E., DE PABLO J.G. Y GONZÁLEZ F. (1984) El complejo de Órdenes: subdivisión, descripción y discusión sobre su origen. *Cadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe*, 7, 139-210.
- NRC (National Research Council) (2001) *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th rev. ed. Washington D.C., EEUU: National Academy of Sciences.
- OLIVER A.L., GRANT R.J., PEDERSEN J.F. Y O'REAR J. (2004) Comparison of brown midrib-6 and -18 forage sorghum with conventional sorghum and corn silage in diets of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 637-644.
- SAS INSTITUTE (2000) *SAS/Stat user's guide*, v.8.1. Cary, NC, EEUU: SAS Institute Inc.
- SCHMID A.R., GOODRICH R.D., JORDAN R.M., MARTEN G.C. Y MEISKE J.C. (1976) Relationships among agronomic characteristics of corn and sorghum cultivars and silage quality. *Agronomy Journal*, 68, 403-406.

3

REUNIONES CIENTÍFICAS



54 REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DE LOS PASTOS (S.E.E.P.)

PASTOS Y FORRAJES EN EL SIGLO XXI PALMA DE MALLORCA 14-17 ABRIL 2015

ADELA MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

Vicepresidenta de la SEEP

El lema de la 54ª Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), "*Pastos y forrajes en el siglo XXI*", surge como un intento de reflexión para facilitar el debate en torno a las actividades turísticas en suelo rústico, a la valoración del paisaje y sus gestores, a la ganadería extensiva y sus productos agroalimentarios de alto valor añadido, a la gestión racional de los bosques, al papel del sector en la prevención de incendios o a los efectos del cambio climático, entre otros temas.

La 54 RC de la SEEP se desarrolló en base a diversas sesiones de trabajo centradas en torno al valor recíproco entre turismo y paisaje, a la productividad de pastos mediterráneos bajo la perspectiva del cambio climático, teniendo en cuenta las especificidades en ganadería y producción de pastos que marca la política agraria común para el periodo 2014-2020, y a las posibilidades de futuro de la ganadería y el aprovechamiento forestal en un entorno cambiante y multifactorial en el que estarán involucrados la gestión de los recursos hídricos, la limitación de superficie agraria disponible, la propia producción animal, la adecuada gestión de los subproductos agrícolas, ganaderos y humanos, etc.

DATOS DE PARTICIPACIÓN

• Participación de España:

- Representación de 13 Comunidades Autónomas.
- Colaboraciones de 11 Universidades Españolas
- Colaboraciones de 4 Centros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Colaboraciones de 8 organismos Públicos de Investigación no CSIC.
- Gobiernos regionales: Consejería de Medio Ambiente y ordenación del Territorio (Andalucía), Oficina técnica de parques naturales (Diputación de Barcelona), Estación fitopatológica de Areiro (Diputación de Pontevedra).
- Jardín Botánico de Córdoba (IMGEMA).
- Laboratorio Interprofesional Lechero de Galicia (LIGAL).
- Fundación Matrix para la Investigación y Desarrollo Sostenible (Pontevedra).
- TRAGSA (Madrid).
- Real Club Deportivo (Mallorca).
- Progando S.L. (Arteixo-Coruña).

• Colaboraciones fuera de España:

- Colaboraciones de 3 Universidades de: Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Universidad de Jalisco (Guadalajara-México) y Wageningen (Netherlands).
- Colaboraciones de Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR, UAEM, México)



Participantes en la 54 Reunión Científica de la SEEP en la Finca Son Forteza de Alaró, Mallorca. Jornada de campo celebrada el 15 de abril de 2015.

■ Esta participación ha generado la siguiente participación:

- 67 inscripciones: Ponentes invitados, delegados, acompañantes, organización
- 4 Ponencias invitadas: 4 ponentes
- 42 Comunicaciones orales.
 - 9 de Botánica y ecología de Pastos.
 - 17 de Producción vegetal.
 - 6 de Producción animal.
 - 10 de Sistemas y recursos silvopastorales.

■ El programa de trabajo se estructuró en:

- 9 Sesiones de trabajo.
- 1 Jornadas de campo en la que se programaron las siguientes actividades:
 - Visita Raixa y presentación edd la Sierra de Tramuntana Patrimonio de la Humanidad
 - Visita explotación agroganadera de Son Forteza (Alaró)
 - Visita a Formentor: cabra asilvestrada y efectos sobre la vegetación en la península de Formentor
 - Visita a Soller: industria Patés Luna
- 1 Visita técnica al campo de Golf "Arabela Golf SON VIDA" incluyendo una Mesa redonda sobre "Sostenibilidad en el uso de cespitosas en ambiente mediterráneo".



RESEÑAS DE TESIS DOCTORALES

■ **Autora:** Diana Carolina López Álvarez.

Título: Evolution, taxonomy and environmental niche variation of the *Brachypodium distachyon* complex species (*Poaceae*).

Programa/Facultad/Universidad: Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza.

Directora: Dra. Pilar Catalán Rodríguez.

Fecha defensa: 12 de febrero de 2016.

Resumen

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un estudio taxonómico, evolutivo, filogeográfico, citogenético y de modelización de nicho ambiental de las tres especies del complejo *B. distachyon* s. l. (*Poaceae*). Además, incluye un estudio filogenético del género *Brachypodium*, con el propósito de conocer el emplazamiento evolutivo de las especies del complejo *B. distachyon* dentro del árbol de especies el género y de estimar los tiempos de divergencia de estos linajes. La tesis está constituida por siete capítulos y dos apéndices, que incluyen una nota breve y un artículo de divulgación. El análisis filogenético actualizado de todos los taxones reconocidos del género *Brachypodium*, revela un complejo escenario reticulado de linajes diploides y alopoliploides recientemente evolucionados. Nuestros resultados apoyan las divergencias tempranas de los linajes anuales y de rizomas cortos (*B. stacei*, *B. mexicanum*, *B. distachyon*) en la región Holártica durante principios del Mioceno Medio (y *B. hybridum* en el Pleistoceno), y una profusión de divergencias más recientes de los linajes perennes desde finales del Mioceno al Pleistoceno en el Mediterráneo y las regiones de Eurasia, con colonizaciones esporádicas en zonas más remotas.

El estudio morfológico, citogenético y evolutivo de los tres citotipos del complejo *Brachypodium distachyon* s. l. muestra que las notables diferencias encontradas entre los tres citotipos son indicativas de los procesos de especiación habidos dentro de este complejo, lo que permite su separación taxonómica en tres especies distintas. Mantenemos el nombre *B. distachyon* para el citotipo $2n=10$ y describimos dos nuevas especies, *B. stacei* y *B. hybridum* para, respectivamente, los citotipos $2n=20$ y $2n=30$.

La ampliación del análisis fenotípico a individuos silvestres de las especies del complejo *Brachypodium distachyon* s.l. muestra que ocho caracteres permiten discriminar significativamente a las tres especies estudiadas. De ellos, la longitud del

grano de polen, longitud total de la espiguilla y el número de flores por inflorescencia no presentan diferencias significativas entre los valores obtenidos en muestras de las poblaciones silvestres y de las líneas autofecundadas, considerándose que pueden estar fijados genéticamente y que son diagnósticos para estas plantas. Los metabolitos aleatorios estudiados también muestran discriminación significativa entre las tres especies y junto con los caracteres morfológicos revelan patrones concordantes de diferenciación.

Proponemos un código de barras genético para la identificación de las tres especies del complejo *Brachypodium distachyon* s. l. *B. distachyon* y *B. stacei* pueden ser identificados con un éxito del 100%, utilizando secuencias directas de los genes trnLF, ITS o G1, mientras que *B. hybridum* sólo puede ser identificado sin ambigüedad a través de la utilización combinada de secuencias de trnLF + ITS (90% de éxito de identificación) o mediante secuencias clonadas del gen *Gigantea* (96,7%). *B. hybridum* ha sido el resultado de cruces bidireccionales de ancestros de *B. distachyon* y *B. stacei* que actuaron indistintamente como progenitores maternos o paternos de los híbridos.

Los marcadores genómicos RAD nos han permitido analizar la variabilidad genética infraespecífica de *Brachypodium distachyon* e inferir las relaciones evolutivas de individuos procedentes de 33 poblaciones circummediterráneas. Las altas tasas de diferenciación genotípica observadas permiten identificar a los individuos y reconstruyen la divergencia profunda de dos linajes principales (Misceláneo y Oriental-Occidental Mediterráneo), posiblemente relacionados con caracteres de tiempo de floración, y una posterior subestructuración en 17 grupos genéticos vinculados a diferentes zonas geográficas. Los análisis citogenéticos preliminares FISH empleando sondas BAC de los cromosomas Bd1, Bd4 y Bd5 de *B. distachyon* han mostrado la localización precisa de nueve loci en los cromosomas de *B. stacei* y *B. hybridum*. Los resultados apoyan una alta colinearidad de los patrones FISH entre los cromosomas de *B. distachyon* y *B. stacei*, con alguna re-estructuración cromosómica, y el alto grado de conservación de los genomas progenitores en los cromosomas del híbrido. La ampliación de estos análisis en el futuro permitirán una mayor transferencia de información citomolecular entre las tres especies.

Palabras Clave: *Brachypodium distachyon*, *Brachypodium stacei*, *Brachypodium hybridum*, circum-Mediterranean native range, cytogenetics, environmental niche

modeling, evolutionary systematics, genetic diversity and structure, haplotypic networks, hybridization, metabolomic, morphology, phylogeography, RADseq markers, speciation, taxonomy.

■ **Autor:** Nuno Miguel Lopes da Silva Santos Simões.

Título: Eficiencia del uso del agua y persistencia de gramíneas perennes en las condiciones de secano en el Mediterráneo.

Dpto./Universidad: Ingeniería medio agronómico y forestal. Universidad de Extremadura.

Directores: Dr. Leopoldo Olea Márquez de Prado, Dr. Manuel María Tavares de Sousa y Dra. Sara Morales Rodrigo.

Fecha defensa: 5 de febrero de 2016.

Resumen

Es de suma importancia encontrar plantas perennes bien adaptadas a las condiciones climáticas presentes en el mediterráneo, que hagan un buen aprovechamiento de la disponibilidad de agua y capacidad de sobrevivir a la sequía del verano. Se planteó un ensayo de gramíneas perennes (siete variedades de *Dactylis glomerata* L., siete de *Festuca arundinacea* Schreb., dos de *Lolium perenne* L. y cuatro de *Phalaris aquatica* L.), midiéndose la producción de materia seca y sus parámetros de calidad (proteína bruta y digestibilidad), bien como la persistencia de las plantas y la eficiencia del uso del agua (WUE). Las variedades de tipo mediterráneo tuvieron una mayor persistencia que las de tipo continental (66,7% en Kasbah y 3,3% en Porto, para *Dactylis* y 65,5% en Flecha E542 y 36,7% en Lutine y Lunibelle, para *Festuca* en otoño de 2008). Las variedades de festuca alta fueron más productivas, con una media de 9.906 kg MS ha⁻¹, que las variedades de las restantes especies (6.338 kg MS ha⁻¹ para *Dactylis*, 7.752 kg MS ha⁻¹ para *Phalaris* y 3.624 kg MS ha⁻¹ para *Lolium*). La WUE de *Festuca* fue superior a la del *Dactylis*. Existieron diferencias entre variedades en la WUE (con valores medios anuales que variaron entre 2,58 g MS kg⁻¹H₂O para Flecha NE y 2,19 g MS kg⁻¹H₂O para Fraydo, en *Festuca* y 2,08 g MS kg⁻¹H₂O para Medly y 1,12 g MS kg⁻¹H₂O para Porto, en *Dactylis*) verificándose una correlación positiva entre la WUE y la producción de materia seca ($r = 0,591$).

Palabras Clave: Pastos.

Disponible en:

<https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1204305>

■ **Autor:** Iago Vázquez Fernández.

Título: Aprendizaje histórico en gestión de bienes comunales: los pastos en Cantabria (España).

Dpto./Universidad: Geografía, Urbanismo y Ordenación del Territorio / Universidad de Cantabria.

Directores: Dra. Leonor de la Puente Fernández y Dr. Juan Busqué Marcos.

Fecha defensa: 5 de febrero de 2016.

Resumen

Los montes de Cantabria albergan bienes comunales de indudable valor económico para las poblaciones rurales, uno lo suministra el bosque, es la leña que se emplea para proveer de fuego y calor a los hogares; otro son los pastos, recursos forrajeros para la alimentación del ganado doméstico. De ambos vienen disponiendo consuetudinariamente los vecinos vinculados a ayuntamientos o juntas vecinales titulares de los montes, lo que popularmente se conoce como el derecho a pastos y leñas. Esta investigación trata sobre los primeros, los denominados pastos comunales, ante la constatación de una progresiva degradación del recurso con graves repercusiones económicas, pero también ambientales, debido a su consideración de hábitats de interés para la conservación a nivel europeo y su localización preferente en espacios naturales protegidos. Tras constatar la dificultad que implica la transferencia de propuestas de mejora, aun sometiénolas a procesos participativos, se avanza un enfoque metodológico innovador que permita incorporar a la planificación la experiencia histórica de gestión de las poblaciones locales. Con ello se contribuye a formular criterios de gestión coherentes no solo con la naturaleza semi-natural de los pastos, creada y reproducida secularmente por la acción del hombre y el ganado, sino también con los usos y costumbres de la población arraigada en el territorio, hacia quienes es fácil transferir prácticas que perciben como propias.

Palabras Clave: Pastos comunales, gestión participativa, geografía histórica, aprendizaje histórico, Cantabria.

Disponible en:

<https://www.educacion.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1209207>

■ **Autor:** William Sánchez Ledezma.

Título: Evaluación de pastos y forrajes para la mejora de la alimentación de las vacas lecheras en la zona alta de Costa Rica.

Programa/Facultad/Universidad: Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza.

Directores: Dr. José Antonio Guada Vallepuga y Dr. Antonio de Vega García.

Fecha defensa: 20 de enero de 2016.

Resumen

Se ha evaluado en las estaciones seca y húmeda la disponibilidad y calidad nutritiva del pasto kikuyo (*Kikuyochloa clandestina*) cuando es aprovechado en pastoreo rotacional a intervalos de 30 días, en tres fincas comerciales ubicadas a los 1800, 2350 y 2700 m de altitud. También se estudió su patrón de crecimiento, mediante cortes quincenales desde los 15 a los 90 días de rebrote en las mismas estaciones y altitudes. Además, se han evaluado como fuentes de forraje complementarias del pasto, dos gramíneas (*Lolium multiflorum*- y kikuyo) y tres cereales forrajeros (avena, maíz y sorgo), valorando su producción, valor

nutritivo y potencial de ensilabilidad cuando son cultivados en las altitudes mencionadas solos o en asociación con veza (*Vicia* sp.) durante la estación húmeda.

Los resultados sobre disponibilidad del pasto kikuyo indican que la producción fue similar entre altitudes durante la época lluviosa ($30,0 \pm 0,08$ t MS ha⁻¹) y superior ($P = 0,0005$) que la registrada en el periodo seco excepto a los 2700 msnm en los que el rendimiento fue menor que a las otras dos altitudes en esta época ($2,0$ vs $2,5 \pm 0,13$ t ha⁻¹). La calidad nutritiva del pasto kikuyo varió poco a lo largo del año y entre altitudes, con excepción del contenido en MS que fue mayor ($P < 0,0001$) en la época seca ($18,8 \pm 0,55\%$) que en la húmeda ($14,6 \pm 0,39$) y superior ($P < 0,0156$) a los 2700 que a los 2350 y los 1800 msnm ($17,9$ vs $15,8$ y $16,4$). La DIVMS tendió a ser algo mayor ($P = 0,0947$) en la época seca que en la lluviosa (73 y 69; SED = 2,14%) mientras que el contenido en PB fue similar entre épocas y altitudes (18,6 a 19,6%) excepto a los 2700 m en los que se paso de un $21,4 \pm 0,45\%$ de PB en la época de lluvias a $17,2 \pm 0,64\%$ en la época seca. La degradabilidad de la MS y la PB del pasto kikuyo no varió significativamente entre la época seca y lluviosa para los valores de la fracción soluble (a), potencialmente degradable (b) y el potencial de degradación (a+b), aunque en el caso de la PB el potencial de degradación tendió ($P = 0,0876$) a ser ligeramente superior en la época lluviosa que en la seca (94,0 vs 93,0 SE= 0,14), mientras que en el caso de la MS, el ritmo fraccional de degradación (c) fue superior ($P = 0,0001$) en la época seca que en la lluviosa (0,0385 vs 0,0375 RSD = 0,33). A pesar de ello y dada la similitud de estos valores, cuando se calculó la degradabilidad efectiva (0,08 h⁻¹), no se apreciaron diferencias significativas entre épocas de pastoreo, siendo aceptable asumir valores medio de degradabilidad de la MS del y de la PB del 41,0 y del 54,7 respectivamente, a intervalos de 30 días. El patrón de crecimiento acumulado del pasto kikuyo se ajustó bien al modelo de Gompertz (R² entre 0,97 y 0,99), pudiéndose estimar que la tasa media de crecimiento de MS alcanzó su máximo valor entre los 49 y los 65 días tras el rebrote, en función de la época y la altitud, con una producción acumulada de 3,3 a 5,9 t ha⁻¹. Sin embargo, a partir de los 45 días de crecimiento la digestibilidad se redujo considerablemente, por lo que al modelizar la producción de MS digestible, la tasa media de crecimiento alcanzó su máximo en torno a los 38 y los 47 días en la época lluviosa y seca, respectivamente. La PB también descendió en promedio 2,52 unidades porcentuales y la FND aumentó en 1,33 unidades entre los 45 y los 60 días de crecimiento, por lo que se sugiere cosechas el pasto kikuyo alrededor de los 45 días. Con respecto a la producción de los cultivos forrajeros, se encontró dificultad de adaptación del maíz y sorgo a la mayor altitud (2700 m) y falta de respuesta a la asociación con la leguminosa en la producción de MS ($P = 0,2576$) y MSD (PO 0,6645). También, se observaron diferencias ($P = 0,0024$) entre forrajes según la altitud de siembra, siendo la avena el cultivo con mayor

producción de MSD por corte en todas las altitudes (7,2, 7,7 y 7,9 t ha⁻¹), aunque el rendimiento por día fue semejante al del kikuyo y el ryegrass (62,2 vs 65,2 kg ha⁻¹ d⁻¹). El maíz fue la única especie con diferencias de rendimiento ($P = 0,0503$) entre los 2350 y los 1800 m de altitud (6,3 y 4,8 SE= 0,387 para 1800 y 2350 m). La asociación con veza redujo el potencial de ensilabilidad e incremento los efluentes en los ensilados de kikuyo y ryegrass, presentando todos los cereales mayor potencial de ensilabilidad, y sus ensilados mejores valores de pH y parámetros de fermentación que los pastos.

■ **Autora:** Pablo Manzano Baena.

Título: Transporte de semillas por las ovejas trashumantes, y sus potenciales implicaciones en la vegetación.

Programa/Facultad/Universidad: Ecología. Universidad Autónoma de Madrid.

Directores: Dr. Juan Esteban Malo Arrazola y Dra. Begoña Peco Vázquez.

Fecha defensa: 22 de diciembre de 2015.

Resumen

El estudio de la dispersión es un componente fundamental de la ecología, pues confiere a los seres vivos de capacidad para responder a condiciones cambiantes o para escapar de la competencia con otros organismos. Dicho estudio adquiere gran complejidad en el caso de los organismos sésiles como las plantas, especialmente los fenómenos a larga distancia (*long distance dispersal*, o LDD), muy habitualmente ligados a la dispersión sexual y por lo tanto a las semillas. Comprender la LDD es clave para entender las dinámicas poblacionales asociadas a las metapoblaciones, la colonización de nuevos ambientes o la naturalización de especies alóctonas. La ganadería extensiva, que representa el uso del suelo más extendido del planeta, ha demostrado ser un vector importante para gran cantidad de especies vegetales, en especial en pastizales. La trashumancia de ovejas, parte importante del paisaje ibérico durante milenios, cubre distancias muy destacables en sus desplazamientos que la señalan como un importante fenómeno a estudiar. La sincronización de dichos desplazamientos con los momentos de mayor disponibilidad de semillas para la dispersión significa que las ovejas trashumantes han sido importantes vectores, tanto para la epizocoria o dispersión de semillas adheridas a su pelaje como para la endozocoria o dispersión por heces, con distancias de gran magnitud recorridas por las semillas dispersadas. La dispersión por ovejas cubre zonas muy amplias y es capaz de superar barreras biogeográficas importantes, resaltando el papel que juega para la conectividad de los ecosistemas. La extraordinaria capacidad de retención de semillas por parte de la lana también podría explicar la naturalización de algunas especies alóctonas de

pastizales. Los intensos fenómenos de depredación de semillas en pastizales mediterráneos por parte de hormigas del género *Messor* afectan a las semillas dispersadas en heces, pero la coincidencia en el tiempo de los movimientos trashumantes con una actividad limitada de las hormigas significa que el impacto en la LDD es limitado, y relativamente mucho más débil que la depredación observada entre movimientos trashumantes durante el verano. Tales procesos dispersivos, junto con otras interacciones ecológicas de la oveja, muestran que la ganadería extensiva con una componente móvil, como en el caso de la trashumanza en España pero también de otros pastores transhumantes o nómadas en las tierras áridas, montañosas y frías del planeta, cataliza procesos ecológicos importantes

para los ecosistemas, derivados de su similitud con los herbívoros silvestres. La comprensión de todos estos fenómenos a una escala global puede ayudar a entender los cambios provocados por el cambio de uso del suelo, la intensificación de la producción ganadera y el incremento del transporte de ganado a grandes distancias. El mantenimiento de las actividades pastoriles puede ser importante para hacer frente al contexto de cambio global en el que se halla inmersa la humanidad.

Palabras Clave: Ecología vegetal, pastos, semillas, ecología animal.

Disponible en:

<https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1191468>

INSTRUCCIONES PARA AUTORES

ÁMBITO DE LA REVISTA

La revista PASTOS admite artículos originales sobre la producción y utilización de pastos y forrajes, dentro de las áreas de conocimiento siguientes: recursos naturales (suelo, agua, clima, etc.) en los que se basa la producción de pastos y forrajes; ecología, nutrición, protección, selección, mejora, manejo y conservación de especies forrajeras y pratenses; nutrición, alimentación y manejo de animales; sistemas de producción animal con base en pastos y forrajes; aprovechamiento de pastos; impacto ambiental de las explotaciones ganaderas; estudios económicos; etc. El envío de un trabajo a PASTOS implica que sus autores no han enviado simultáneamente el mismo original a otra revista para su publicación.

CESIÓN DE DERECHOS DE LOS AUTORES

Dado que la revista es de libre acceso, la publicación en PASTOS implica la cesión de los derechos de los autores para que PASTOS pueda difundir sus artículos a través de las bases de datos que estime oportunas.

IDIOMAS

La revista PASTOS acepta artículos originales en español e inglés.

TEXTOS ORIGINALES

Los textos originales se escribirán utilizando el programa Word de Microsoft Office. No se requiere ninguna especificación en cuanto a formato (fuente de letras, espacios, etc). La extensión máxima de los artículos científicos será de 70.000 caracteres (sin espacios). Para las revisiones científicas y ponencias de reuniones científicas no hay un límite prefijado de caracteres.

ENVÍO DE LOS ORIGINALES

Se enviarán por correo electrónico a uno o a los dos editores principales de la Revista PASTOS, D. Juan Busqué Marcos (juanbusque@cifacantabria.org) y D. Ramón Reiné Viñales (rreine@unizar.es).

PROCESO DE REVISIÓN DE LOS ORIGINALES

Los editores principales enviarán los originales recibidos a uno de los editores asociados del área al que corresponda el trabajo. El editor asociado asignará la evaluación a un mínimo de dos revisores anónimos externos y expertos en la temática.

ORGANIZACIÓN DEL TEXTO

Los artículos científicos tendrán la siguiente disposición:

- Título principal en idioma original (máximo 25 palabras)
- Título en segundo idioma (inglés o español)

- Título abreviado (para cabecera de páginas; máximo 50 caracteres con espacios)
- Nombre autor/es
- Dirección autor/es
- Correo electrónico del autor de contacto
- Resumen en idioma original
- Resumen en segundo idioma (inglés o español)
- Palabras clave en idioma original
- Palabras clave en segundo idioma (inglés o español)
- Introducción
- Material y métodos
- Resultados
- Discusión (o junto a Resultados)
- Conclusiones
- Agradecimientos
- Referencias bibliográficas

NOMBRE DEL AUTOR O AUTORES

Nombre completo y dos apellidos. La dirección de los autores incluirá la dirección postal completa. Si los distintos autores tienen direcciones diferentes, debe indicarse con un superíndice numérico.

Se señalará el autor para la correspondencia con un asterisco y una nota con su correo electrónico a continuación de las direcciones.

Ejemplo: Juan Fernández García*¹, Antonio Gómez Ferrán¹ y Raúl Andrés Sarmiento²

¹ Área de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Cádiz. Plaza de la Ciencia s/n E-25371 Cádiz (España).

² Área de Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Toledo. E-45071 Toledo (España).

* jfgarcia@tmail.com

RESUMEN

Debe ser informativo, no indicativo, para permitir al lector apreciar el contenido e interés del trabajo. Debe informar sobre objetivos, metodología, resultados y conclusiones. En su contenido no debe haber referencias ni al texto, ni a las figuras, ni a las tablas del artículo resumido. Máximo de 300 palabras para artículos científicos y notas de investigación, y 450 para las revisiones científicas.

PALABRAS CLAVE

El resumen irá seguido de un máximo de cinco palabras clave que no estén contenidas en el título.

SUBAPARTADOS

Para los apartados "Material y Métodos", "Resultados" y "Discusión", se podrá estructurar el texto en unidades menores como subapartados jerarquizados.

TABLAS

Las tablas deben estar concebidas y estructuradas de tal modo que puedan leerse y entenderse por sí mismas, con independencia del texto. Se recomienda hacerlas con el procesador de textos y nunca insertadas como imagen desde otro programa. Se situarán al final del texto, después del apartado de referencias bibliográficas, aunque los autores podrán indicar su preferencia de ubicación en el trabajo. Los títulos irán encima de las tablas.

Se traducirá al segundo idioma inmediatamente debajo del título en idioma original.

FIGURAS

Las figuras deben estar concebidas y diseñadas de tal modo que puedan leerse y entenderse por sí mismas, con independencia del texto. Se enviarán en formato JPG o TIF a una resolución mínima de 300 ppp, o como fichero de excel. Se indicará en el texto del artículo su lugar de inserción. Se recomienda que las figuras sean originalmente en color, pero cuidando que sean comprensibles en la escala de grises. El pie (título de la figura) no formará parte de la figura. Se escribirá a continuación de las tablas con la correspondiente traducción al segundo idioma.

FOTOGRAFÍAS

Se recomienda incluir dos fotografías que ayuden a entender mejor aspectos importantes del trabajo. Estas deberán enviarse como archivos TIF, JPG o PSD, con una calidad mínima de 300 ppp. Se publicarán en color. El pie (texto de la fotografía) no formará parte de la fotografía. Se escribirá en el texto a continuación de los pies de figuras con la correspondiente traducción al segundo idioma. Se recomienda especificar el autor de la fotografía.

CITAS DENTRO DEL TEXTO

Todas las citas que aparezcan en el texto deben figurar también en el apartado de referencias bibliográficas, situado al final del texto, y viceversa.

1. Si el nombre/s del autor/es no forma parte del texto se citarán solamente los apellidos, sin iniciales, entre paréntesis, en letra minúscula, seguidos del año de la publicación, separado por una coma, en el lugar que corresponda.

Ejemplos: Caso de un autor "... (Garcés, 1995a)...", caso de dos autores "... (Pérez y Marqués, 2005)...", caso de más de dos autores "... (Navarro *et al.*, 2010)..."

2. Si el nombre/nombres del autor/es forma parte del texto se pone el año entre paréntesis.

Ejemplos: "...según los trabajos de Garcés (1995a), Pérez y Marqués *et al.* (2005), Navarro *et al.* (2010), ...".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (al final del texto)

Las referencias bibliográficas se ordenarán por orden alfabético de apellidos del autor o primer autor, si son varios. Para distintos trabajos de un mismo autor, o autores, se seguirá el orden cronológico del año de publicación. Si en un mismo año hay más de una publicación de un autor, o autores, se distinguirán añadiendo una letra al año de publicación.

Ejemplo: 2013a, 2013b.

Forma de presentación de las referencias al final del texto:

• Caso de revistas:

Formato:

APELLIDO/S INICIAL/ES [del nombre],..... Y APELLIDO/S INICIAL/ES [del nombre] [de los autores] (año) Título del artículo. *Nombre completo de la revista [en cursiva]*, volumen (número), primera página-última página (del artículo).

Ejemplos:

PÉREZ A. Y MARQUÉS C. (2005) Caracterización de un sistema productivo forrajero basado en el uso de recursos endógenos. *Pastos*, 27(2), 124-145.

NAVARRO A.M., REQUÉS G. Y FERNÁNDEZ-RICO V. (2013) Factores asociados al crecimiento de *Dactylis glomerata* L. bajo distintos niveles de fertilización nitrogenada. *Pastos*, 41(2), 1-14.

• Caso de libros de un solo autor o grupo de autores para toda la obra:

Formato:

APELLIDO/S INICIAL/S [del nombre],..... Y APELLIDO/S INICIAL/S [del nombre] [de los autores] (año) *Título del libro [en cursiva]*. Ciudad de la Editorial, País: Nombre de la Editorial.

Ejemplos:

ALONSO MARTÍNEZ J. (2008) *Los recursos forrajeros de la baja Extremadura*. Badajoz, España: Ediciones Alday.

JONES J., INGLISH J.K. Y SMITH A.S. (2012) *British grasslands under siege*. Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.

• Caso de libros colectivos, con capítulos escritos por distintos autores:

Formato:

APELLIDO/S INICIAL/S [del nombre],..... Y APELLIDO/S INICIAL/S [del nombre] [de los autores] (año) Título del artículo o capítulo. En: Apellido/s Inicial/s [del nombre],..... y Apellido/s Inicial/s [del nombre] [de los editores] (Ed, si es solamente un editor, o Eds, si son dos o más editores) *Título del libro (en cursiva)*, pp. primera página-última página (del artículo o capítulo). Ciudad de la Editorial, País: Nombre de la Editorial.

En el caso de que haya más de dos editores se pondrá solamente el primero seguido de las palabras *et al.*

Ejemplos [con uno o dos editores]:

SMITH A. (2010) Measuring productivity. En: Taylor B.J.F. (Ed) *Measures of pasture systems*, pp. 25-40. Bristol, Australia: Ferguson and Liar Ltd.

MARTÍNEZ N. Y RUÍZ M.T. (2002) Fuegos prescritos. En: García P. y Bosque M. (Eds) *Usos y problemática del fuego*, pp. 115-147. Ciudad Real, España: Verdeamor.

Ejemplo [con tres o más editores]:

GARCÍA-NAVARRO R., ALVARENGA J. Y CALLEJA A. (2009) Efecto de la fertilización fosfórica sobre la presencia de especies en el forraje de prados de montaña. En: Reiné R. *et al.* (Eds) *La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas*, pp 197-203. Huesca, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

• Caso de recursos en internet:

En el caso de que la referencia bibliográfica tenga un acceso URL a su contenido, se recomienda especificarlo al final de la referencia con la fecha de consulta.

Ejemplo:

ALONSO MARTÍNEZ J. (2008) *Los recursos forrajeros de la baja Extremadura*. Badajoz, España: Ediciones Alday.

Disponible en: <http://pastosextremadura.org/librorecursos.pdf>. Consulta: 14 abril 2013.

UNIDADES DE MEDIDA

Para las unidades de medida se seguirá el SI (Sistema Internacional de Unidades). En general, los símbolos se escriben en minúsculas, salvo si se trata de la primera palabra de una frase o del nombre "grado Celsius", quedando invariables en plural. Nunca los símbolos van seguidos de punto, salvo si se encuentran al final de una frase. En este caso el punto corresponde a la ortografía habitual de la frase pero no forma parte del símbolo (es incorrecto escribir kg., ha., km.).

El símbolo de litro será L cuando vaya precedido por un número y l cuando lo sea por un prefijo de fracción (ejemplo, ml). Cuando las unidades no vayan precedidas por un número se expresarán por su nombre completo, sin utilizar su símbolo. Ejemplos de símbolos comunes: kilogramo = kg, hectárea = ha, metro = m, kilómetro = km. (en este último caso el punto no forma parte del símbolo, se pone porque es final de frase).

Expresión algebraica de los símbolos de las unidades SI

1. Multiplicación. Cuando una unidad derivada está formada multiplicando dos o varias unidades, los símbolos de las unidades se separarán por un espacio. *Ejemplo:* N m.
2. División. Cuando una unidad derivada está formada dividiendo una unidad por otra, se puede utilizar una barra inclinada (/), una barra horizontal o exponentes negativos. *Ejemplo:* m/s o m s⁻¹. No debe utilizarse la barra inclinada y los exponentes negativos en un mismo artículo. Hay que optar por uno de los dos.
3. Nunca, en una misma línea, debe seguir a una barra inclinada un signo de multiplicación o de división, a no ser que se utilicen paréntesis para evitar toda ambigüedad. *Ejemplo 1:* m/s² o m s⁻², son expresiones correctas, pero m/s/s, es incorrecta. *Ejemplo 2:* m kg/(s³ A) o m kg s⁻³ A⁻¹, son expresiones correctas, pero m kg/s³/A y m kg/s³ A, son incorrectas.

NOTACIÓN NUMÉRICA

1. En el texto se utilizarán palabras para los valores de cero a nueve y cifras para los valores superiores.
2. Debe dejarse un espacio entre grupos de tres dígitos, tanto a la izquierda como a la derecha de la coma (15 739,012 53). En números de cuatro dígitos puede omitirse dicho espacio. Los

números de los años deben escribirse sin separar el primer dígito del segundo (es correcto escribir año 2011). Ni el punto, ni la coma deben usarse como separadores de los miles.

Ejemplo: el número ciento veintitrés millones trescientos veinticinco mil ciento setenta se escribe 123 325 170 (123.325.170 o 123,325,170 son formas incorrectas).

3. Las operaciones matemáticas solo deben aplicarse a símbolos de unidades (kg/m³) y no a nombres de unidades (kilogramo/metro cúbico).
4. Debe estar perfectamente claro a qué símbolo de unidad pertenece el valor numérico y qué operación matemática se aplica al valor de la magnitud. *Ejemplo:* es correcto escribir 35 cm x 48 cm o 100 g ± 2 g (35 x 48 cm o 100 ± 2g son formas incorrectas).

CIFRAS DECIMALES

Dentro del texto en español:

Se separarán de la parte entera por una coma abajo (,).

Ejemplo: 10,17 (10.17 es forma incorrecta).

Dentro del texto en inglés (summary):

Se separarán de la parte entera por un punto.

Ejemplo: 10.17 es correcto.

ABREVIATURAS

Las abreviaturas deberán definirse la primera vez que se mencionen en el texto (*Ejemplo:* "política agraria común (PAC)") y de nuevo en todas las tablas y figuras donde aparezcan.

NOMBRES DE PLANTAS, CULTIVARES, ETC.

El nombre botánico de las plantas se escribirá en cursiva, en letra minúscula, con excepción de la primera del género, que será mayúscula.

El nombre de las variedades comerciales, o cultivares, se escribirá con letra normal y entre comillas simples o bien con letra normal precedido de cv (símbolo de cultivar) cuando sigan al nombre botánico de la especie.

Ejemplo: *Lolium multiflorum* Lam. "Tama" o *Lolium multiflorum* Lam. cv Tama.

En el caso de cultivos de microorganismos se indicará la procedencia y denominación cuando estén depositados en colecciones reconocidas. Los nombres vulgares de plantas deben ir seguidos del nombre botánico entre paréntesis la primera vez que aparezcan en el texto.