

INVESTIGACIONES SOBRE LA FLORA FORRAJERA NATURAL EN MEJORAS DE PASTOS, RESTAURACIÓN FORESTAL Y SILVICULTURA PREVENTIVA CON GANADO: UNA EXPERIENCIA PILOTO EN SIERRA NEVADA

ANA BELÉN ROBLES CRUZ¹, M^a EUGENIA RAMOS FONT¹,
MAURO TOGNETTI BARBIERI¹, MANUEL FERNÁNDEZ LÓPEZ¹,
LUISA M^a SANDALIO GONZÁLEZ¹, PABLO VILLADAS LATORRE, ANA V. LASA¹,
RAMÓN J. REINE VIÑALES², JOSÉ L. GONZÁLEZ REBOLLAR¹

RESUMEN

Se presenta parte de los resultados del proyecto financiado por el OAPN sobre la flora forrajera natural del Espacio Natural de Sierra Nevada, en relación con sus posibilidades de empleo técnico en mejora de pastos naturales, restauración de zonas degradadas, gestión y protección del monte mediterráneo. Este estudio se centra en una zona piloto de dicho Espacio (Lanjarón) afectada por un incendio (2005) de 3425 ha. Su objetivo general ha sido colaborar en el plan de restauración de la zona e incorporar a la gestión del monte actividades de silvicultura preventiva con manejo ganadero; y los objetivos específicos: seleccionar leguminosas de los pastos naturales, analizar sus características nutricionales, sus limitaciones de germinación, y dilucidar la incidencia de diferentes métodos de fertilización (incluidos los microorganismos de la rizosfera) en el establecimiento de las especies seleccionadas, todo ello en condiciones de campo. A tal fin se ha georreferenciado en el territorio «fuentes semilleras» en las que recolectar las especies, ensayado técnicas de escarificación de semillas, análisis de su valor nutritivo (clásico y antioxidantes), aislamiento de bacterias nodulantes, estimaciones de su producción (forraje y semillas) ensayando diferentes técnicas de fertilización del suelo (redileo, micorrización e inóculos bacterianos), de cara a asegurar su establecimiento en campo. Los resultados muestran mayor valor nutritivo de los géneros *Vicia* y *Lathyrus*, aunque *Trifolium cherleri* presentó buen contenido de antioxidantes totales y no enzimáticos; el trillado es el método más eficaz y rápido para promover la germinación; los rizobios propuestos para ensayos de fertilización son *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti*; el redileo es el método de fertilización más eficaz y el género *Vicia* fue el más productivo (forraje y semillas); por ello y por su mayor valor nutritivo consideramos que las especies de este género son las más apropiadas para la restauración ecológica del monte.

Palabras clave: Pastos naturales, Restauración silvopastoral, Leguminosas, Germinación, Valor nutritivo, Producción, Fertilización (microbiológica y redileo).

¹ Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC). Profesor Albareda 1. 18008 Granada.

² Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

RESEARCH ON THE NATURAL FORAGE FLORA FOR PASTURES IMPROVEMENT, FOREST RESTORATION AND WILDFIRE PREVENTION WITH LIVESTOCK MANAGEMENT: A PILOT EXPERIENCE IN SIERRA NEVADA

ABSTRACT

Some of the results of the project funded by the OAPN on the natural forage flora of the Sierra Nevada Natural Area are presented, in relation to its possibilities of technical utilization in the improvement of natural pastures, restoration of degraded areas, management and protection of the Mediterranean rangelands. This study focuses on a pilot area of the Natural Area (Lanjarón) affected by a fire (2005) of 3,425 ha. Its general objective has been to collaborate in the restoration plan of the area and to incorporate to the forestry management some activities for preventive silviculture with livestock management; and the specific objectives were: to select legumes from natural pastures, analyze their nutritional characteristics, their germination limitations, and elucidate the incidence of different fertilization methods (including micro-organisms of the rhizosphere) in the establishment of the selected species, all of which in field conditions. For this purpose, «seed sources» have been georeferenced in the territory in which to collect the species, seed scarification techniques has been tested, analysis of their nutritional value (classical and antioxidants) has been carried on, nodular bacteria have been isolated, production (forage and seeds) has been estimated, testing different techniques of soil fertilization (sheep penning, mycorrhization and bacterial inocula), in order to ensure its establishment in the field. The results showed higher nutritional value of the genera *Vicia* and *Lathyrus*, although *Trifolium cherleri* presented good content of total and non-enzymatic antioxidants; threshing is the most effective method to promote germination; the rhizobia proposed for fertilization trials are *Rhizobium leguminosarum* and *Sinorhizobium meliloti*; sheep penning is the most effective method of fertilization and the genus *Vicia* was the most productive (forage and seeds); for this reason and for its greater nutritional value we consider that the species of this genus are the most appropriate for the ecological restoration from the rangelands.

Keywords: Natural pastures, Silvopastoral restoration, Legumes, Germination, Nutritional value, Production, Fertilization (microbiological and sheep penning).

INTRODUCCION

La restauración de los pastos naturales es considerada clave en la mitigación de la amenaza del cambio global a nivel mundial (JAMES *et al.*, 2013). Las leguminosas herbáceas juegan un importante papel en los ecosistemas perturbados debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (PORQUEDDOU & GONZÁLEZ 2006), así como en la alimentación del ganado por su elevado valor nutritivo y por sus otros efectos beneficiosos asociados con la presencia de taninos y flavonoides condensados (ROCHON *et al.*, 2004). Sus semillas se caracterizan por presentar dormancia física debido a su gran dureza, que les hace impermeables al agua (BASKIN *et al.*, 2003). En ambientes secos, este es un mecanismo ecológico fundamental para la supervivencia de las especies, sin embargo, no favorece el establecimiento de las semillas en campo. Frecuentemente, en ecosistemas forestales de montaña, los suelos suelen tener baja fertilidad y deben ser mejorados para incrementar el contenido de nutrientes del suelo. En espacios protegidos se aconseja utilizar enmiendas de suelo que sean respetuosas con el medio ambiente, como son las fertilizaciones orgánicas, entre las que se incluyen: la práctica tradicional de redileo (SAN MIGUEL 2001) y la utilización de microorganismos fijadores de nitrógeno y/o micorrizas (LEIGH 2002; BAREA 2005). Otro aspecto, a tener en cuenta, en los planes de mejora de pastos y restauración ambiental es el origen y trazabilidad de las semillas, las cuales deben restringirse a especies y ecotipos autóctonos, para lo cual es necesario disponer de semillas recolectadas y / o producidas en esas áreas (RAMOS-FONT *et al.*, 2016). Hay que señalar el escaso conocimiento científico-técnico que se posee sobre las especies silvestres que componen los pastos naturales y de las técnicas de manejo para restaurarlos (JAMES *et al.*, 2013).

En septiembre del año 2005 se produjo uno de los mayores incendios forestales ocurridos en el Espacio Natural de Sierra Nevada, originado en el Barranco de Lanjarón (Granada), y afectó a 3416,74 ha en su mayoría ocupadas por vegetación natural (GOMEZ-ZOTANO *et al.*, 2005). En las fechas que siguieron al referido episodio, una parte del equipo científico del presente artículo, fue convocado por la administración del Espacio Natural para colabo-

rar en la elaboración de Plan de Emergencia, cuyos criterios de actuación se vieron reflejados en el Plan de Restauración de la zona afectada (Monte del Siglo XXI), y por nuestra parte, en la redacción del proyecto financiado por el Organismo Autónomo Parques Nacionales (OAPN), cuyo título coincide con el de este artículo.

Dentro de este contexto, dicho proyecto y el trabajo que presentamos aquí tienen como objetivo principal investigar las posibilidades que ofrece la flora silvestre para el empleo técnico en actuaciones de mejora de pastos naturales, planes de restauración de la cubierta vegetal y técnicas de silvicultura preventiva frente a los riesgos de incendios con empleo de ganado, utilizando como marco el Espacio Natural de Sierra Nevada (Andalucía). Sus objetivos concretos son: seleccionar las leguminosas de los pastos naturales, analizar sus características nutricionales y de germinación, y dilucidar la incidencia de diferentes métodos de fertilización (redileo, bacterias nodulantes y micorrizas) en el establecimiento de las especies seleccionadas, todo ello en condiciones de campo. Dichos aspectos tienen su proyección en la gestión del monte mediterráneo, y redundan en muchos otros enfoques de las políticas de recuperación de tierras en abandono (despoblamiento rural), control de la desertificación (degradación del medio), incremento de la capacidad de uso del suelo (desarrollo socioeconómico); y en muchos otros desafíos actuales de las políticas de desarrollo rural. En definitiva, se trata de analizar la posibilidad de incorporar elementos locales de valor a la gestión del monte, generando condiciones que, al incrementar la capacidad de uso sostenible del suelo (en este caso, de los pastos naturales), fomenten el interés por la conservación del medio en aquellos sectores sociales más directamente concernidos por la mejora pastos o la restauración del medio natural.

Este proyecto ha generado la continuidad de nuestra investigación, tanto en el ámbito nacional, a través de la creación del grupo operativo autonómico (Junta de Andalucía) GOP11-GR-16-0012: Semillas silvestres en restauración de agrosistemas mediterráneos (SERESAM) (coordinado por la EEZ-CSIC), que formaliza la conexión de un grupo científico de pastos con sectores demandantes de la industria agroalimentaria y del ámbito de las semi-

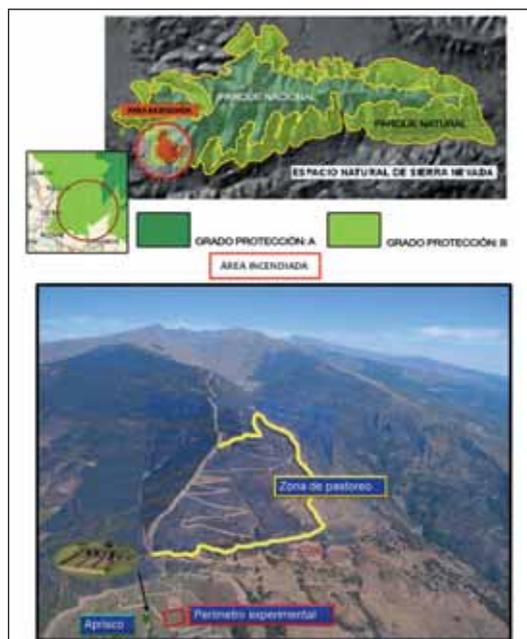


Figura 1. Situación del Incendio en el Espacio Natural de Sierra Nevada (Lanjarón, Granada): año 2005, 3416,74 ha. Situación del perímetro pastoral, zona experimental y aprisco.

Figure 1. Situation of the forest fire in the Natural Area of Sierra Nevada (Lanjarón, Granada): year 2005, 3416.74 ha. Situation of the pastoral perimeter, experimental zone and sheepfold.

llas silvestres; como en el internacional, dentro del proyecto INTERREG SUDOE OPEN2PRESERVE: Modelo de gestión sostenible para la preservación de espacios abiertos de montaña [coordinado por la Universidad Pública de Navarra (UPNA)].

MATERIAL Y MÉTODOS

La Figural refleja el perímetro afectado por el incendio (3416,74 ha) que ocurrió en el Espacio Natural de Sierra Nevada (Lanjarón, Granada) el 22/09/2005 (GÓMEZ-ZOTANO *et al.*, 2005). Se delimita la zona seleccionada por los gestores del territorio para llevar a cabo las actuaciones de manejo pastoral, incluye un perímetro experimental de siembras (mejora de pastos) y un aprisco para el ganado (pastoreo).

Prospección de especies y recolección de semillas

Entre abril y julio (2013 a 2016) se realizaron numerosas prospecciones en campo para localizar y georreferenciar distintas fuentes semilleras de legu-

minosas de interés forrajero del Espacio Natural de Sierra Nevada (Granada) y zonas de influencia (500 m y 1900 m) (Figura 2). Posteriormente, las especies fueron recolectadas y, en laboratorio, fueron prensadas y determinadas siguiendo la Flora de Andalucía Oriental (BLANCA *et al.*, 2009). A continuación, se procedió a la recolección de semillas. El material recolectado fue secado a temperatura ambiente y, posteriormente, se separaron las semillas por especie, mediante trillado manual o mecánico. Una vez limpias, fueron almacenadas en cámara fría (2 °C). Estas semillas se utilizaron para los ensayos de germinación, siembra y microbiológicos.

Ensayos de germinación

Con el fin de incrementar la germinación y facilitar el establecimiento en campo de las especies leguminosas seleccionadas, se ensayaron distintos métodos (térmicos, mecánicos y químicos) de ruptura de la dormancia física de las semillas. Las especies estudiadas fueron: *Lathyrus cicera* L., *L. clymenum* L., *L. sphaericus* Retz, *L. tingitanus* L., *Lens nigricans* (M. Bieb.) Godr., *Lupinus angustifolius* L., *Medica-*

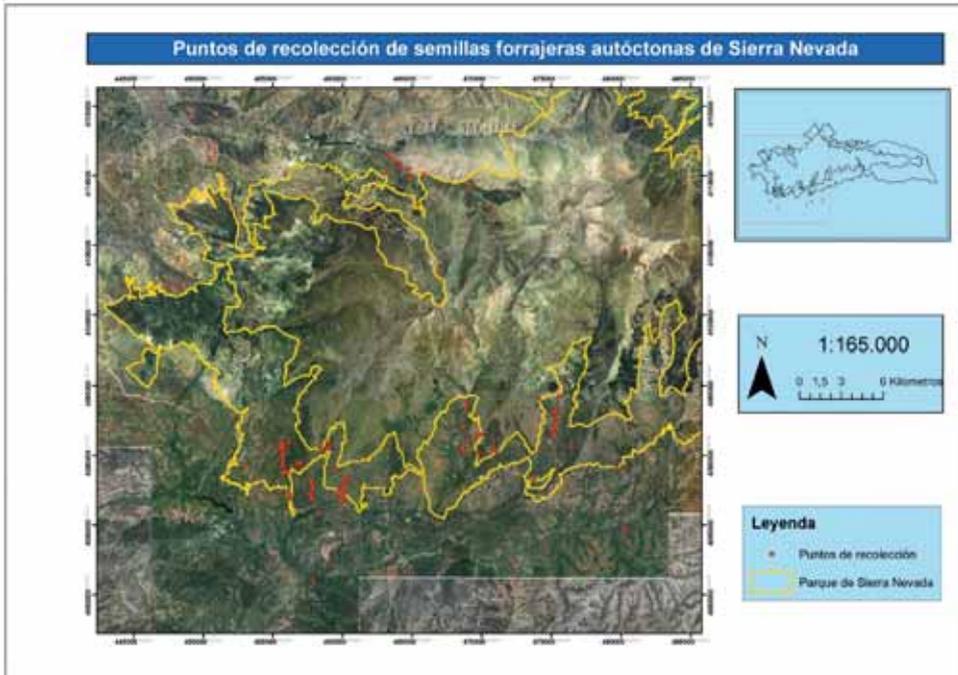


Figura 2. Mapa con los puntos de prospección de leguminosas autóctonas del Espacio Natural Sierra Nevada.

Figure 2. Map including the prospecting sites of wild legumes from Sierra Nevada Natural Area.

go polymorpha L., *M. rigidula* (L.) All., *M. minima* (L.) L., *M. truncatula* Gaertn., *M. orbicularis* (L.) Bartal., *Trifolium cherleri* L., *T. glomeratum* L., *T. scabrum* L., *T. tomentosum* L., *Vicia disperma* DC., *V. amphicarpa* L., *V. monantha* Retz., *V. lutea* L. y *V. sativa* L.. Los tratamientos aplicados en cada especie fueron: 1) Control, con semillas intactas sin tratar (C), 2) Inmersión en agua caliente a 70 °C, durante 15 minutos (70), 3) Inmersión en agua caliente a 80 °C, durante 5 minutos (80), 4) Escarificación con peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 3%), en 10 minutos (Oxi) y 5) Lixiviación en flujo de agua fría durante 24 horas (Lix).

Por otra parte, a la luz de los resultados del ensayo anterior, especialmente en el género *Medicago* (ver apartado de Resultados y Discusión), se ensayaron tratamientos de escarificación mecánica, principalmente, para cuantificar la capacidad de escarificación de las máquinas trilladoras utilizadas durante el proceso de limpieza de semillas. Se utilizaron las

mismas especies, excepto *L. angustifolius*, *T. scabrum*, *T. tomentosum*, *M. minima* y *M. orbicularis* ya que posteriormente no se sembraron en los perímetros experimentales. Se incluyó *V. pseudocracca*, que fue recolectada en posteriores campañas. Los tratamientos ensayados fueron: 1) Control, que consiste en semillas intactas separadas del fruto a mano, 2) semillas escarificadas a mano con ayuda de una lija (Escarificado) y 3) semillas que han sido separadas mediante trilladora (Trilladora). Los lotes de semillas utilizados fueron diferentes a los del anterior ensayo, por no haber número suficiente, por lo que es posible encontrar alguna discrepancia en los resultados.

En todos los ensayos, las semillas fueron sembradas en placas de Petri (25 semillas/placa y 6 placas/tratamiento). Todos los materiales utilizados para la siembra, incluidas las semillas, fueron esterilizadas previamente (vapores de una mezcla de lejía y HCl). Las placas fueron colocadas en una cámara de ger-

minación en condiciones de 23/16 °C (16 h día y 8 h noche, respectivamente). La germinación fue evaluada cada día durante las tres primeras semanas y cada dos días hasta el final del ensayo (30 días). La suma de todas las semillas germinadas respecto al total de colocadas se expresó como porcentaje de germinación.

Valor nutritivo de las especies

Se han diferenciado dos tipos de análisis para determinar el valor nutritivo de las especies seleccionadas: i) calidad del forraje (valoración nutritiva clásica de forrajes) y ii) capacidad antioxidante. En el estudio de pastos naturales es más generalizado el primer tipo de análisis. Existen poco estudios sobre el contenido de antioxidantes en pastos, por lo que estos análisis se han realizado en un gran número de especies prospectadas en el espacio natural (agrupadas por géneros). La valoración nutritiva clásica se determinó en las especies sembradas en las parcelas experimentales (Lanjarón y Soportújar).

Calidad del forraje. Se han analizado muestras de las especies sembradas en las parcelas experimentales situadas en Lanjarón (1320 m) y Soportújar (1352), correspondiente a las siembras del año agronómico 2014-15, y recolectadas en mayo de 2015. En cada localidad se sembraron los especies más idóneas a las condiciones ambientales, tomando como base los resultados de las siembras de 2013-14 (RAMOS *et al.*, 2016).

Las especies analizadas fueron, en Lanjarón: *L. cicera*, *L. sphaericus*, *M. rigidula*, *V. amphicarpa*, *V. disperma*, *V. monantha*, *T. cherleri*; y en Soportújar: *L. cicera*, *L. clymenum*, *L. nigricans*, *M. truncatula*, *V. amphicarpa*, *V. disperma*, *V. monantha* y *V. Lutea*. En ambas localidades, también se analizaron el conjunto de plantas adventicias (especies que nacen espontáneamente entre las especies sembradas) con el objetivo de comparar su calidad con las especies sembradas en los ensayos. Para cada localidad y especie se analizaron cuatro réplicas. Todas las muestras se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C hasta peso seco constante. Posteriormente se trituraron mediante un molino refrigerado (tamiz con luz de 1 mm Ø) y se procedió a determinar su valor nutritivo

por NIRS (Near Infrared Spectroscopy) de acuerdo con las ecuaciones desarrolladas en el Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA (Laboratorio Oficial del Principado de Asturias) y acreditadas por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) (Acreditación N° LE 430/930) (SERIDA 2018). Los parámetros analizados fueron: materia seca (MS) cenizas (CEN), proteína bruta (PB %), fibra neutro detergente (FND %), fibra ácido detergente (FAD %), lignina (LAD) y digestibilidad materia orgánica (DMO) (Digestibilidad enzimática FND-celulasa).

Capacidad antioxidante. Se ha estudiado: i) la actividad antioxidante total (ATT), ii) los antioxidantes enzimáticos: catalasa y actividad peroxidasa total, y iii) los antioxidantes no enzimáticos: fenoles y flavonoides. Las plantas fueron recolectadas en los términos municipales de Lanjarón (1300-1330 m), Soportújar (1350 m) y Trevélez (1400-1470 m), Torvizcón (700-900 m). Las especies analizadas fueron: 1) *Medicago litoralis* Rohde ex Loisel, *M. minima*, *M. orbicularis*, *M. polimorfa*, *M. rigidula* y *M. truncatula*, 2) *L. cicera*, *L. clymenum*, *Lathyrus sphaericus* Retz., *L. cicera* y *L. tingitanus*, 3) *Lens nigricans*, 4) *Lupinus angustifolius*, 5) *Vicia: V. amphicarpa*, *V. angustifolia*, *V. disperma*, *V. lutea*, *V. monantha* y *V. sativa*, y 6) *Trifolium: T. cherleri*, *T. glomeratum* *T. tomentosum*.

La actividad antioxidante total (AAT) se analizó para planta completa y fresca, en extractos de material fresco obtenidos en buffer fosfato, mediante el método de SÁNCHEZ-BEL *et al.* (2012) que se basa en la capacidad de los antioxidantes de secuestrar el radical catiónico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, ABTS), utilizando como referencia una curva estándar de ascorbato (ASC).

Los antioxidantes enzimáticos, catalasa (CAT) y guaiacol peroxidasa total (GPX), se llevaron a cabo con la eliminación del H₂O₂ para prevenir daños oxidativos. Se ensayaron plantas completas en extractos de material fresco mediante espectrometría según describen SANDALIO *et al.* (2001).

Los fenoles y flavonoides, se obtuvieron a partir de extractos metanólicos de planta completa. El contenido total de fenoles se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu y análisis espectrofotométrico.

trico a 760 nm, según el método de VITALINI *et al.* (2006). Como estándar se utilizó una curva con concentraciones conocidas de ácido gálico. El contenido de flavonoides en los extractos se determinó espectrofotométricamente según QUETTIER-DE-LEU *et al.* (2000), utilizando un método basado en la formación de un complejo flavonoide-aluminio que absorbe a 430 nm. Como estándar se utilizó una curva de quercetina. Estos dos parámetros se han realizado en planta completa, tanto en material fresco como en material seco, éste último secado en estufa a 60 °C durante 48 h y procedentes de la misma recolección que el fresco.

Ensayos de siembra y producción de semillas

Para evaluar la producción de forraje y semillas se ensayaron distintas estrategias para mejorar de la fertilidad del suelo de los terrenos donde se realiza-

ron las siembras. Se llevaron a cabo siembras en los periodos: 2013/14, 2014/15 y 2015/16.

En 2013/14 la siembra tuvo lugar en tres zonas: i) Lanjarón (Cortijo Peinado), ii) Soportújar (Vivero de la Sombra) y iii) Granada (IFAPA-Camino de Purchil) (Figura 3). La zona de Lanjarón es un terreno forestal que se desbrozó en 2010 eliminando el matorral, en Soportújar se trata de un antiguo vivero forestal con terrazas que se ha utilizado durante varios años para guardar el ganado de noche, y la parcela del Granada está ubicada en suelo de vega y disponía de riego por aspersión (tres riegos de 30 L/m² durante el ensayo). Esta última localidad se utilizó, principalmente, para obtener semilla para otros años. Previamente a la siembra los suelos fueron analizados (Tabla 4) y posteriormente abonados con una enmienda orgánica de estiércol de oveja peletizada (4000 kg ha⁻¹). Composición de la

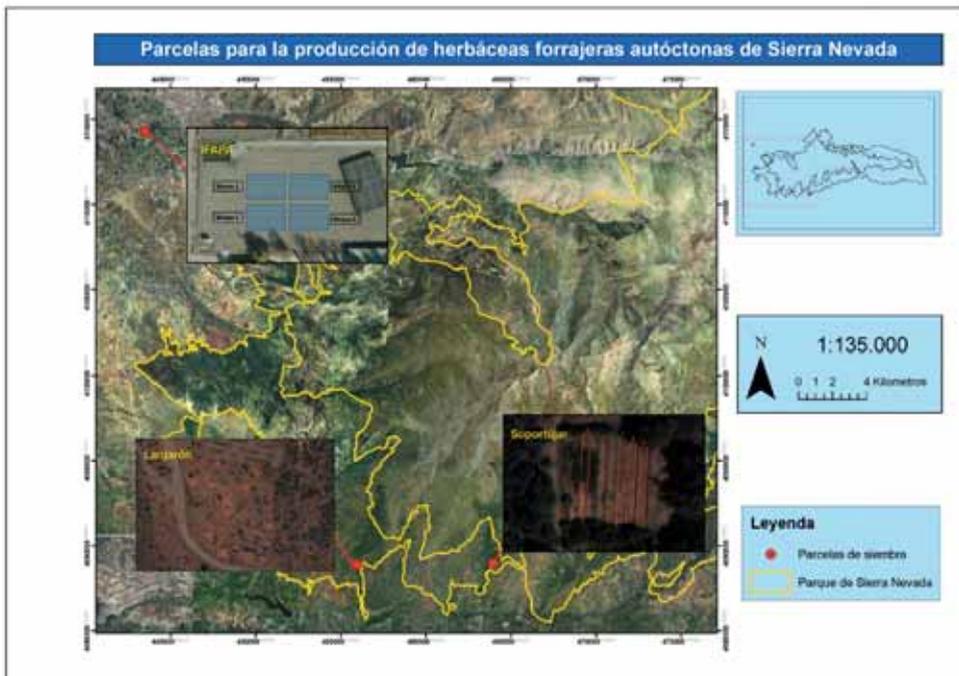


Figura 3. Ubicación de las parcelas de siembra. En el Espacio Natural de Sierra Nevada: Lanjarón y Soportújar; y en el IFAPA de Granada (parcelas para producir semillas)

Figure 3. Situation of seeding areas. In the Natural Area of Sierra Nevada: Lanjarón and Soportújar; and in the IFAPA of Granada (plots to produce seeds)

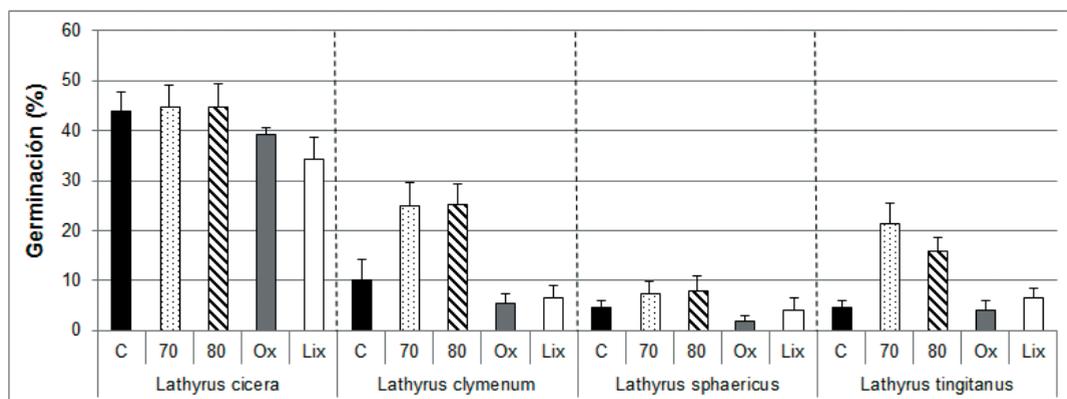


Figura 4. Porcentaje de germinación para cuatro especies del género *Lathyrus*. C: control, 70: inmersión en agua a 70 °C, 80: inmersión en agua a 80 °C, Ox: escarificación en peróxido de hidrógeno, Lix: lixiviación.

Figure 4. Germination percentage for four species of the genus *Lathyrus*. C: control, 70: immersion in water at 70 °C, 80: immersion in water at 80 °C, Ox: scarification in hydrogen peroxide, Lix: lixiviation.

enmienda: Materia orgánica: 69,4%; C orgánico: 40,2%; N total: 2,3%; N amoniacal: 0,3%; N orgánico: 1,9%; P₂O₅ total: 1,7%; K₂O total: 7,1%; Extracto húmico total: 7,1%; Ácidos húmicos: 4,3%; Ácidos fúlvicos: 2,8%; C/N: 22; pH: 7,7; Humedad: 8-15%; Conductividad eléctrica (dS/m): 7,5.). El diseño fue de bloques al azar con cuatro repeticiones.

A luz de los resultados de siembra del primer año (2013/14), se seleccionaron las especies más promisorias para sembrarlas en los terrenos forestales (Lanjarón y Soportújar) durante 2014/15 y 2015/16. Aquí se evaluaron diferentes ensayos de fertilización. El diseño experimental fue diferente en ambas localidades debido a las características del cada terreno:

— Lanjarón. Diseño de bloques al azar, en ambos años, con cuatro bloques, y dos factores: abonado (factor principal) y especie (factor anidado). El factor «abonado» con cuatro tratamientos:

- Control. Suelo sin ningún tipo de abonado.
- Redileo. En julio de 2014 y de 2015 se instalaron cuatro rediles (uno por bloque) de 150 m² cada uno. En cada uno, se encerraron 350 ovejas durante tres días consecutivos (16 horas día⁻¹).
- Redileo y micorrizas. Parcelas con redileo en las cuales, además, se aplicó una solución con mi-

corrizas (Glomigel, suministrado por Mycovitro S.L.), en una dosis equivalente a 1250 l ha⁻¹.

- Inóculo de bacterias. Las semillas fueron peletizadas con especies y simbiovares de rizobios que fueron identificadas y aisladas por VILLADAS *et al.* (2016) en el mismo área para las especies sembradas.

En el año 2015/16, seis semanas después de la siembra se volvieron a sembrar las parcelas de «redileo» y «redileo con micorrizas», ya que un jabalí entró y destrozó la mayor parte de éstas. Por falta de disponibilidad de semillas no se pudo resembrar *Trifolium cherleri*.

— Soportújar. Para ambos años, diseño de parcelas completamente aleatorizadas con dos factores: abonado y especies. El factor «abonado» constaba de dos tratamientos:

- Control. Suelo sin ningún tipo de abonado.
- Micorrizas. La aplicación de las micorrizas se hizo directamente sobre suelo control. El inóculo y concentración del mismo fueron idénticos a los ya descritos para Lanjarón.

La Tabla 1 recoge la dosis y el año de siembra de cada una de las especies.

Especies	Dosis	Año de siembra		
	(g/m ²)	Granada	Lanjarón	Sopotújar
<i>Lathyrus cicera</i>	15	2013	2013/14/15	2014/15
<i>Lathyrus clymenum</i>	12	2013	-	2014/15
<i>Lathyrus sphaericus</i>	10	2013	2013/14/15	-
<i>Lathyrus tingitanus</i>	15	2013	2013	2013
<i>Lens nigricans</i>	6	2013	-	2013/14/15
<i>Lupinus angustifolius</i>	15	2013	-	-
<i>Lothus ornithopodioides</i>	3	2013	-	-
<i>Medicago arabiga</i>	3	2013	-	-
<i>Medicago orbicularis</i>	4	2013	-	2013
<i>Medicago polymorpha</i>	3	2013	2013	-
<i>Medicago rigidula</i>	4	2013	2013/14/15	-
<i>Medicago truncatula</i>	5	2013	-	2014/15
<i>Medicago spp.*</i>	3	2013	2013	2013
<i>Trifolium cherlerii</i>	3	2013	2013/14/15	2013
<i>Trifolium glomeratum</i>	2	2013	2013	2013
<i>Trifolium scabrum</i>	2	2013	-	-
<i>Trifolium tomentosum</i>	2	2013	-	-
<i>Vicia amphicarpa</i>	9	2013	2013/14/15	2014/15
<i>Vicia angustifolia</i>	9	2013	-	-
<i>Vicia disperma</i>	10	2013	2013/14/15	2013/14/15
<i>Vicia lutea</i>	12	2013	2013	2013/14/15
<i>Vicia monantha</i>	9	2013	2013/14/15	2013/14/15
<i>Vicia sativa</i>	12	2013	2013	-

**Medicago spp.*: compuesta por distintas especies del género *Medicago*, principalmente, *M. polymorpha* y *M. truncatula*.

Tabla 1. Listado de especies sembradas, dosis de siembra y año/s en los que fue sembrada cada especie.

Table 1. List of sown species, seeding dose and seeding date for each species.

Todos los años se preparó el terreno con un cultivador y se replantearon las parcelas (4 réplicas por especie y tratamiento) cuyos tamaños fueron de 3 x 2 m, 2 x 2 m o 2 x 1,5 m, según la disponibilidad de semilla de cada especie. Las siembras se realizaron a mano, en surcos separados unos 25 cm. Previamente, se tomaron muestras de suelo para su análisis.

Para cada parcela se evaluó: i) producción de forraje (kg de materia seca (MS) ha⁻¹) y ii) producción de semillas (kg ha⁻¹). Para la producción de forraje se cortaron 4 cuadrados de 25 x 25 cm por cada parcela. Posteriormente se secaron las plantas en estufa de aire forzado a 60 °C, hasta peso seco constante. La producción de

semilla se evaluó mediante el corte de la parcela completa. Debido a las condiciones de sequía de los años de estudio, plagas de pulgones y olas de calor, para algunas localidades y/o especies no se obtuvieron semillas.

Estudio Microbiológico

Se caracterizaron las bacterias que nodulan las especies utilizadas en los ensayos de siembra. El estudio microbiológico comprendió las siguientes etapas: i) aislamiento de bacterias del interior de nódulos, ii) genotipado mediante RAPD fingerprinting, y iii) secuenciación y análisis de los genes *rrs*, *recA*, *atpD*, *glnII* y *nodC*.

Aislamiento de bacterias del interior de nódulos. Con el objetivo de aislar bacterias noduladoras de los géneros dominantes en el área de estudio: *Lathyrus*, *Medicago*, *Trifolium* y *Vicia* en el área de estudio, se tomaron muestras de suelo y se recolectaron semillas de las especies más abundantes de dichos géneros en los perímetros experimentales de Sierra Nevada: *L. sphaericus*, *L. cicera*, *M. polymorpha*, *M. rigidula*, *T. cherleri*, *T. glomeratum*, *V. amphicarpa* y *V. disperma*. El protocolo de germinación de semillas fue el mismo que el descrito anteriormente en el apartado de germinación. Una vez germinadas, estas se dispusieron en macetas preparadas con una mezcla 3:1 de arena previamente esterilizada y el suelo muestreado en la zona de Lanjarón, tal y como describen COBO-DÍAZ *et al.* (2014). Tras un periodo de incubación de 21 días (ciclos día/noche de 16/8 h y 22/16 °C), se retiraron las plantas de las macetas y se aislaron los nódulos radiculares individualmente. Éstos fueron esterilizados en superficie y sembrados en medio de cultivo TY (BERINGER 1974) conforme refieren TORO *et al.* (2017) con el objetivo de aislar los rizobios de su interior.

Genotipado mediante RAPD fingerprinting. La diversidad genética de los aislados bacterianos fue analizada mediante la técnica RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) para obtener perfiles electroforéticos característicos de cada cepa (DURÁN *et al.*, 2013). A partir de cultivos líquidos en medio TY, se extrajo el DNA genómico de cada uno de los aislados empleando el kit comercial Real Pure Genomic DNA Extraction Kit (Durviz, Valencia) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, para obtener perfiles electroforéticos con los que poder distinguir incluso diferentes cepas pertenecientes a una misma especie de rizobio, se obtuvieron los patrones RAPD con el primer M13, y los correspondientes dendrogramas tal y como detallan VILLADAS *et al.* (2017).

Secuenciación y análisis de los genes rrs, recA, atpD, glnII y nodC. Para identificar las cepas aisladas, se amplificó mediante PCR y se secuenció el gen rrs que codifica el RNA de la subunidad ribosomal pequeña procariota (RIVAS *et al.*, 2007). Además, se analizaron los genes de copia única recA y atpD para una mayor resolución intragenérica (GAUNT *et al.* (2001). En el caso de las cepas aisladas de los

géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium*, adicionalmente se amplificó y secuenció el gen glnII (VINUESA *et al.*, 2005), de utilidad para la identificación de las especies pertenecientes al grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum*. En todos los casos se amplificó y secuenció el gen de nodulación nodC (LAGUERRE *et al.*, 2001), implicado en la síntesis de los factores de nodulación, necesarios para establecer la simbiosis con la planta hospedadora.

La construcción de los árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas fue realizada de acuerdo a VILLADAS *et al.* (2017).

RESULTADOS

Prospección de especies y recolección de semillas

Se censaron un total de 54 especies y 12 géneros y entre éstas se seleccionaron 24 especies (Tabla 2) por su mayor interés forrajero y abundancia, incluidas en siete géneros: *Lathyrus* (4 spp.), *Lens* (1 spp.), *Medicago* (6 spp.), *Lotus* (1 spp.), *Lupinus* (1 spp.), *Trifolium* (4 spp.) y *Vicia* (7 spp.).

Ensayos de germinación

Nuestros resultados ponen de manifiesto el diferente comportamiento germinativo de las distintas especies, incluso dentro del mismo género (Figura 4 a 8). En este mismo sentido, ARGEL & PATON (1999), estudiando varias especies, encontraron que incluso diferentes lotes de la misma especie, responden de forma distinta frente a los tratamientos germinativos.

En el género *Lathyrus*, *L. clymenum* y *L. tingitanus* aumentaron el porcentaje de germinación, respecto al control, en los tratamientos con temperatura (70 °C y 80 °C), aunque los valores siguieron siendo bastante bajos (entre el 16% y el 25%), y no hubo diferencias significativas en *L. tingitanus* y *L. sphaericus* (Figura 4). Los tratamientos de agua caliente pueden ser muy efectivos a la hora de eliminar la dureza, provocando la separación del estrofiolo del resto de la semilla y la rotura de la testa (BASKIN 2003). También, *L. nigricans* se vio muy favorecida por el calor, sobre todo, a 80 °C (76 %), y algo menor para 70 °C

Especies	Fuente semillera (Municipio)
<i>Lathyrus cicera</i> L.	Lanjarón, Lecrín, Juviles, Cáñar,
<i>Lathyrus clymenum</i> L.	Lanjarón, Torvizcón, Almegíjar, Lecrín
<i>Lathyrus sphaericus</i> Retz.	Lecrín, Lanjarón, Busquistar, Órgiva
<i>Lathyrus tingitanus</i> L.	Órgiva, Almegíjar, Lobras
<i>Lens nigricans</i> (M. Bieb.) Godr.	Lecrín, Lanjarón, Bubión, Busquistar
<i>Lotus ornithopodiodes</i> L.	Vélez de Benaudalla
<i>Lupinus angustifolius</i> L.	Lanjarón, Cáñar
<i>Medicago arabica</i> (L.) Huds.	Güéjar Sierra
<i>Medicago littoralis</i> Rohde ex Loisel	Lanjarón, Lecrín
<i>Medicago orbicularis</i> (L.) Bartal.	Güéjar Sierra, Torvizcón, Lobras
<i>Medicago polymorpha</i> L.	Güéjar Sierra, Torvizcón, Lobras, Órgiva
<i>Medicago rigidula</i> (L.) All.	Almegíjar, Bubión, Busquistar, Güéjar Sierra, Juviles, Lanjarón, Lecrín, Lobras
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	Búsquistar, Lanjarón, Lobras, Órgiva
<i>Trifolium cherleri</i> L.	Cáñar, Lanjarón, Lecrín
<i>Trifolium glomeratum</i> L.	Bubión, Busquistar, Cáñar, La Tahá, Capileira, Lanjarón, Lobras, Torvizcón
<i>Trifolium scabrum</i> L.	Busquistar, Güéjar Sierra, Juviles
<i>Trifolium tomentosum</i> L.	Busquistar, Lobras
<i>Vicia amphicarpa</i> L.	Lanjarón, Busquistar
<i>Vicia benghalensis</i> L.	Lecrín
<i>Vicia disperma</i> DC	Lanjarón, Lecrín
<i>Vicia lutea</i> L.	Almegíjar, Busquistar, Cáñar, Lanjarón, Lecrín, Lobras, Órgiva, Trevélez
<i>Vicia monantha</i> Retz.	Lanjarón
<i>Vicia sativa</i> L.	Lanjarón, Lobras, Torvizcón
<i>Vicia pseudocraca</i> Bertol.	Lecrín

Tabla 2. Listado de especies cuyas semillas fueron recolectadas de distintos municipios pertenecientes al Espacio Natural Sierra Nevada (Granada) y zonas de influencia.

Table 2. List of species whose seeds were collected in different municipalities from Sierra Nevada Natural Area (Granada) and influence area.

(41 %); mientras que *L. angustifolius*, no respondió a ninguno de los tratamientos (Figura 5). Por otra parte, el agua caliente afectó negativamente a la germinación en todas las especies de *Medicago*, excepto el tratamiento 80 °C en *M. orbicularis* (Figura 6). Estos datos no son coherentes con los obtenidos por otros autores que observaron una estimulación de la germinación en *M. polymorpha* con agua caliente (CAN *et al.*, 2009; KHAEF *et al.*, 2011). Nuestra hipótesis indica que, probablemente, durante el trillado para limpiar las semillas, estas se podrían haber escarifica-

do y el agua caliente podría haber provocado daños en los embriones. Similar explicación podría haber ocurrido con la especie *T. scabrum*, que redujo su germinación con el mismo tratamiento. Sin embargo, para el resto de especie del género *Trifolium*, también fue más efectivo el tratamiento con calor a 70 °C y, especialmente, a 80 °C aunque sólo hubo diferencias significativas en *T. glomeratum* (RAMOS *et al.*, 2016) (Figura 7). OLEA *et al.* (1989) encontraron resultados similares. En *T. cherleri* los valores más elevados fueron para el tratamiento 80, aunque sin diferencias

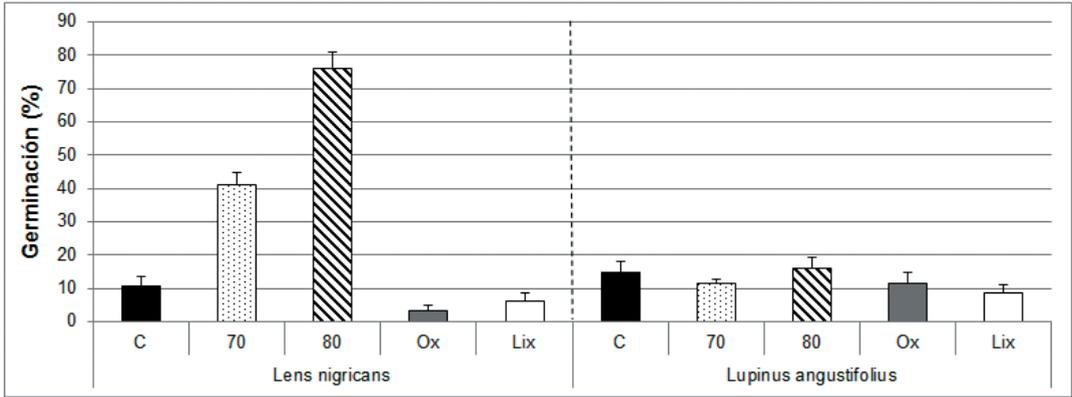


Figura 5. Porcentaje de germinación para *Lens nigricans* y *Lupinus angustifolius*. C: control, 70: inmersión en agua a 70 °C, 80: inmersión en agua a 80 °C, Ox: escarificación en peróxido de hidrógeno, Lix: lixiviación.

Figure 5. Germination percentage for *Lens nigricans* y *Lupinus angustifolius*. C: control, 70: immersion in water at 70 °C, 80: immersion in water at 80 °C, Ox: scarification in hydrogen peroxide, Lix: lixiviation.

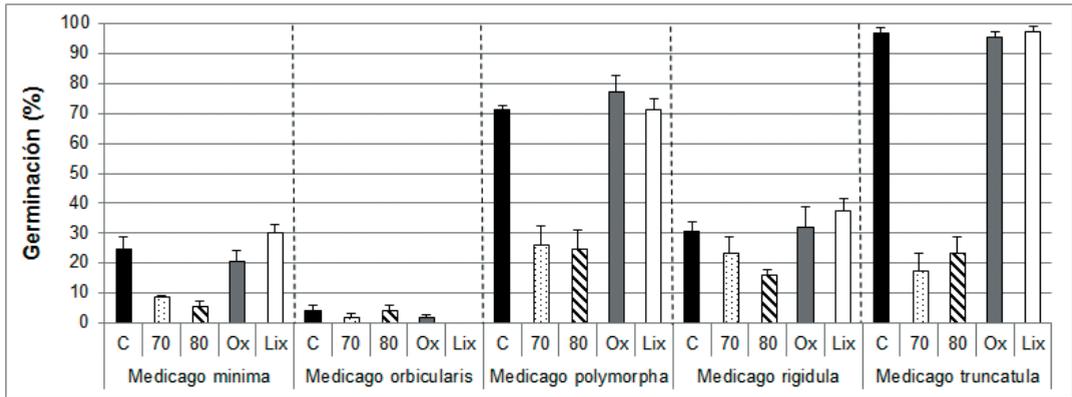


Figura 6. Porcentaje de germinación para cinco especies del género *Medicago*. C: control, 70: inmersión en agua a 70 °C, 80: inmersión en agua a 80 °C, Ox: escarificación en peróxido de hidrógeno, Lix: lixiviación.

Figure 6. Germination percentage for five species of the genus *Medicago*. C: control, 70: immersion in water at 70 °C, 80: immersion in water at 80 °C, Ox: scarification in hydrogen peroxide, Lix: lixiviation.

significativas entre las especies (RAMOS-FONT *et al.*, 2016).

En este mismo sentido, en el género *Vicia*, los tratamientos de temperatura (70 °C y 80 °C) incrementaron en mayor o menor medida el porcentaje de germinación en todas las especies (Figura 8), excepto en *V. amphicarpa*. Mientras en *V. disperma* y *V. mo-*

nantha la germinación fue mayor a 80 °C (superior a 50 %), en *V. lutea* se obtuvo a 70 °C (35 %). Sólo en *V. sativa* la germinación fue más fue mayor con el tratamiento de H₂O₂ (57 %).

Respecto al ensayo de escarificación mecánica, en todos los casos fue mayor la realizada con lija, cercana al 100%, excepto en *M. rigidula* (80 %). Tam-

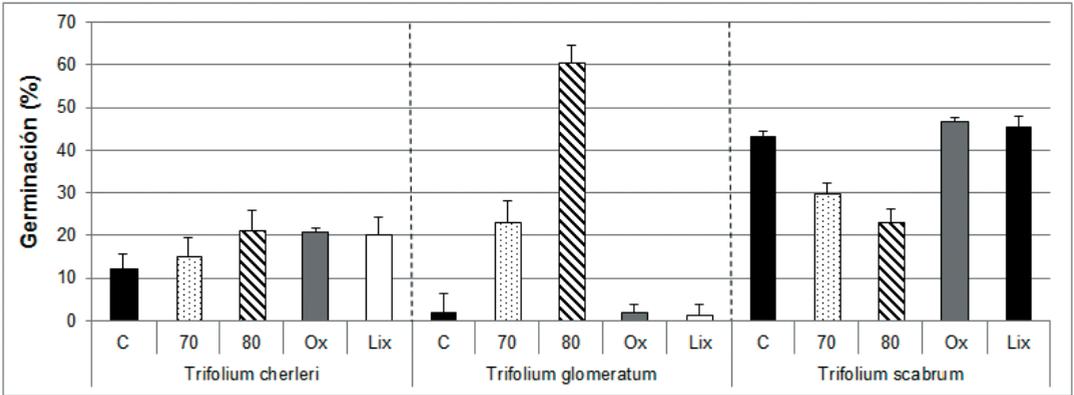


Figura 7. Porcentaje de germinación para tres especies del género *Trifolium*. C: control, 70: inmersión en agua a 70 °C, 80: inmersión en agua a 80 °C, Ox: escarificación en peróxido de hidrógeno, Lix: lixiviación.

Figure 7. Germination percentage for three species of the genus *Trifolium*. C: control, 70: immersion in water at 70 °C, 80: immersion in water at 80 °C, Ox: scarification in hydrogen peroxide, Lix: lixiviation.

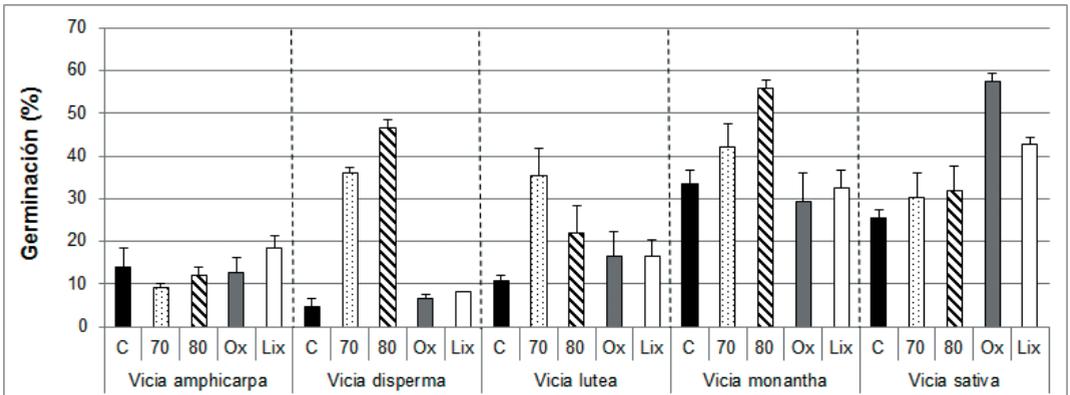


Figura 8. Porcentaje de germinación para cinco especies del género *Vicia*. C: control, 70: inmersión en agua a 70 °C, 80: inmersión en agua a 80 °C, Ox: escarificación en peróxido de hidrógeno, Lix: lixiviación.

Figure 8. Germination percentage for three species of the genus *Vicia*. C: control, 70: immersion in water at 70 °C, 80: immersion in water at 80 °C, Ox: scarification in hydrogen peroxide, Lix: lixiviation.

bién, fue muy evidente el efecto escarificador de la trilladora, con porcentajes de germinación superiores al 70%, en *L. tingitanus*, *M. polymorpha*, *T. cherleri*, *V. angustifolia*, *V. monantha* y *V. sativa*, y entre 50% y 60 % para *L. cicera*, *M. rigidula*, *M. truncatula*, *V. amphicarpa* y *V. lutea* (Figura 9). Tan solo *L. clymenum* fue inferior al 10%, sin embargo con escarificado manual alcanzó el 100%.

Valor nutritivo de las especies

Calidad del forraje. La Tabla 3 muestra los resultados de los parámetros analíticos relacionados con la valoración nutritiva clásica de las especies estudiadas. La MS fue bastante similar en todas las especies y el rango de variación en las CEN fue también pequeño. Este parámetro está relacionado con

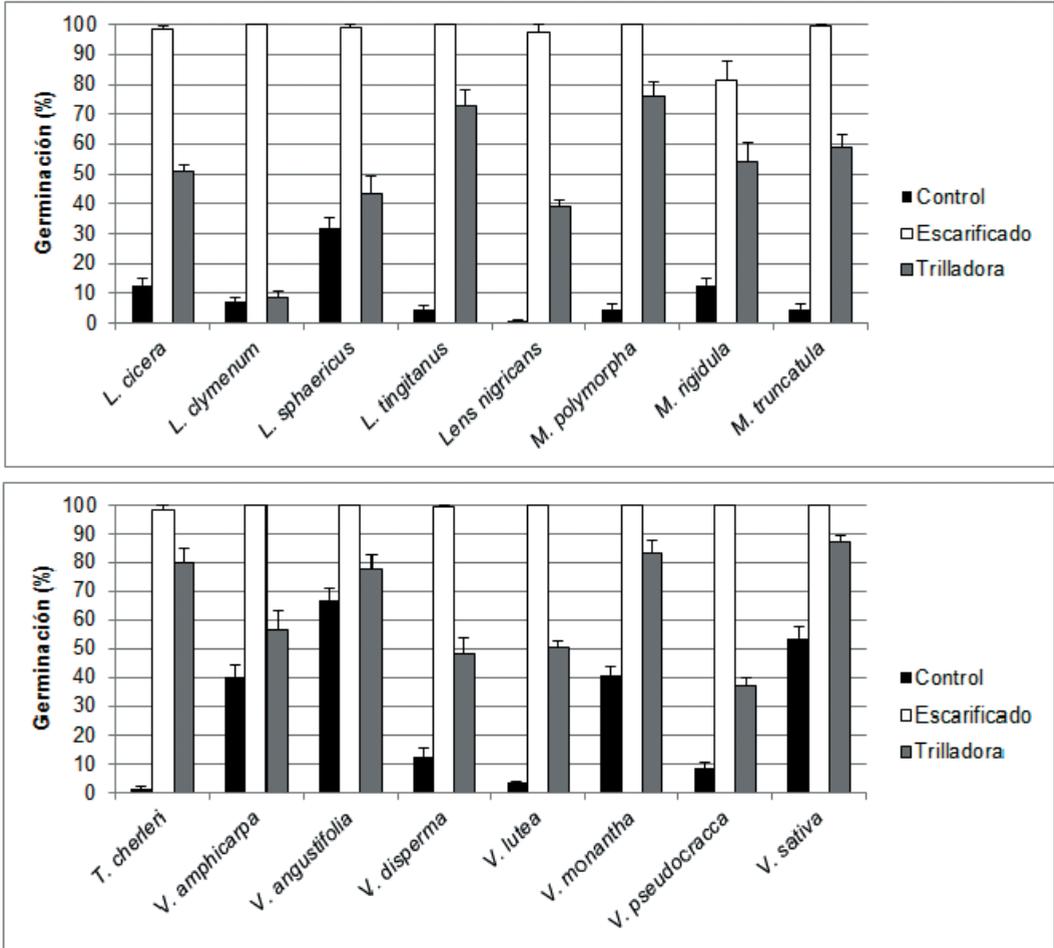


Figura 9. Porcentaje de germinación de 16 leguminosas silvestres. Control: semillas intactas, separadas a mano; Escarificado: semillas escarificadas manualmente con lija; Trilladora: semillas separadas mediante trilladora.

Figure 9. Germination percentage for 16 wild legumes. C: control, hand separated seeds; Scarified: seeds manually scarified with sandpaper; Trilladora: seeds separated by threshing machine.

el contenido en minerales (CALSAMIGLIA *et al.*, 2016), y fue ligeramente mayor en *L. tingitanus*, *L. nigricans* y *M. rigidula*, y menor en las especies arvenses de Lanjarón.

Destaca el buen contenido de la PB de la mayoría de las especies, y las especies arvenses mostraron los valores más bajos, aunque, en Soportújar fue

algo más elevado, probablemente, debido a la mayor contribución de leguminosas para este grupo en esta localidad. Las especies con mayor PB fueron *V. lutea*, *V. monantha*, y también fueron muy buenas (PB > 18%), *L. sphaericus*, *V. amphicarpa*, *L. clymenum* y *L. nigricans*. Opuestamente, *T. cherleri* fue la menor, seguida de otra especie de porte rastro, *M. rigidula*.

Especies	Loc.	MS ± ES (%)	CEN ± ES (%)	PB ± ES (%)	FND ± ES (%)	FAD ± ES (%)	LAD ± ES (%)	DEMO ± ES (%)
<i>L. cicera</i>	Lanj.	91,51±0,23	9,24 ± 0,60	16,16 ± 0,45	35,64 ± 0,72	21,74 ± 0,38	4,54 ± 0,23	75,10 ± 0,75
	Sop.	91,94±0,08	9,48 ± 0,58	17,94 ± 0,50	42,31 ± 0,58	27,62 ± 0,29	4,22 ± 0,27	66,78 ± 1,13
<i>L. sphaericus</i>	Lanj.	91,58 ± 0,12	9,49 ± 0,07	19,9 ± 0,56	32,8 ± 0,15	21,62 ± 0,32	4,97 ± 0,12	74,77 ± 0,30
<i>L. tingitanus</i>	Sop.	91,2 ± 0,09	11,61 ± 0,85	15,99±1,41	42,23±2,52	30,37±1,76	3,82±0,12	58,75±3,27
<i>L. clymenum</i>	Sop.	91,92±0,04	9,63±0,34	19,23±1,04	42,90±1,15	28,50±0,86	4,25±0,06	62,58 ± 1,68
<i>L. negricans</i>	Sop.	91,65±0,26	11,29±0,36	18,36±0,14	41,80±0,82	27,74±0,26	5,15±0,24	61,34 ± 0,00
<i>M. rigidula</i>	Lanj.	91,59±0,39	10,75±0,44	14,18±0,82	42,30±0,86	28,87±0,94	5,44±0,28	60,88 ± 0,62
<i>M. truncantula</i>	Sop.	91,69±0,01	8,93±0,32	15,91±0,41	45,07±1,28	30,57±0,14	5,00±0,16	60,68 ± 1,40
<i>T. cherleri</i>	Lanj.	91,24±0,04	8,98±0,12	13,36±0,12	48,04±0,23	31,70±0,067	5,47±0,16	57,82 ± 0,03
<i>V. amphicarpa</i>	Lanj.	91,88±0,33	9,13±0,10	19,41±0,21	37,60±0,23	25,35±0,56	4,79±0,22	68,26 ± 0,32
	Sop.	91,52±0,10	8,48±0,11	18,74±0,94	43,34±0,62	29,51±0,96	4,51±0,16	62,28 ± 0,72
<i>V. disperma</i>	Lanj.	91,77±0,12	8,73±0,33	17,57±0,58	37,66±0,56	25,70±0,61	5,51±0,36	67,99 ± 0,62
	Sop.	91,54±0,07	8,23±0,78	17,16±0,40	44,23±1,08	31,85±1,05	4,97±0,05	60,02 ± 1,06
<i>V. lutea</i>	Sop.	91,46±0,12	8,60±0,79	22,96±0,54	40,21±0,46	28,98±0,30	4,86±0,16	64,01 ± 0,35
<i>V. monantha</i>	Lanj.	91,61±0,12	9,57±0,22	20,52±0,16	36,18±0,38	27,86±0,46	5,82±0,17	66,97 ± 0,53
	Sop.	91,49±0,12	9,65±0,45	20,17±0,52	41,54±0,92	33,92±0,64	5,14±0,01	61,02 ± 1,14
Especies adventicias	Lanj.	91,76±0,12	7,82±0,50	9,03±0,31	52,47±0,57	33,74±0,43	4,01±0,26	54,39 ± 1,00
	Sop.	91,72±0,14	8,35±0,30	13,23±1,32	50,33±0,24	33,60±0,51	3,92±0,51	55,77 ± 2,11

Tabla 3. Valor nutritivo de las especies sembradas según localidades (Loc.): Lanjarón (Lanj.) y Soportújar (Sop.). Parámetros analizado expresados en porcentajes (% ± error estándar): materia seca (MS), cenizas (CEN), proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD) y digestibilidad de la materia orgánica (DEMO, digestibilidad enzimática FND-celulasa).

Table 3. Nutritive value of the species sown according to localities (Loc.): Lanjarón (Lanj.) and Soportújar (Sop.). Analysed parameters expressed in percentages (% ± standard error): dry matter (DM), ash (CEN), crude protein (PB), neutral detergent fiber (FND), acid detergent fiber (FAD), acid detergent lignin (LAD) and digestibility of organic matter (DEMO, enzymatic digestibility NDF-cellulase).

La FND fue mayor en las especies arvenses (> 50 %) que en las especies sembradas, lo que indica su peor calidad. Las especies *L. sphaericus*, *L. cicera*, *V. monantha*, *V. amphicarpa* y *V. disperma* presentaron menor FND, lo que indica su mayor calidad; contrariamente, *T. cherleri* presentó el mayor valor. En relación a la FAD, los valores más elevados los obtuvieron *L. sphaericus*, *L. cicera*, *V. amphicarpa* y *V. disperma*, y los menores *V. monantha* junto a las especies arvenses. Las LAD más baja la tuvieron *L. tingitanus*, *L. cicera* y *L. clymenum*, los mayores *V. monantha*, *V. disperma* y *T. cherleri*. En todos los casos las especies de Lanjarón mostraron una mayor LAD, probablemente debido a que es una localidad con condiciones climáticas más secas, lo que determina que las paredes celulares estén más lignifica-

das. En general, todas las especies tuvieron una alta digestibilidad (> 60 %), incluso las especies arvenses (alrededor del 50 %). Las especies más digestibles fueron *L. cicera*, *L. sphaericus*, *V. amphicarpa*, *V. disperma* y *V. monantha* (Lanjarón) y, de nuevo, *T. cherleri* fue el más bajo.

Teniendo en cuenta que los componentes fibrosos de las paredes celulares (FND, FAD y LAD) están inversamente relacionados con la digestibilidad de los forrajes (CALSAMIGLIA *et al.*, 2016), en general, se observa que los parámetros analizados fueron siempre mayores en las especies sembradas que en las especies arvenses, con excepción de la lignina, que fue menor en este grupo. Esto puede deberse al dominio de gramíneas en su composición florísti-

ca, familia caracterizada por tener menor LAD que las leguminosas (MATIN-ROSST *et al.*, 2012). La digestibilidad de la materia orgánica es uno de los factores que mejor determina el valor nutritivo de los forrajes, junto a la proteína y su capacidad de ingestión (DEMARQUILLY & ANDRIEU 2006). Si comparamos nuestros resultados con la alfalfa en rama (*Medicago sativa* L.), especie conocida por su alto porcentaje de proteína (17,4 %) (DE BLAS *et al.*, 2010), la mayoría de las especies analizadas supera este valor. Destaca el buen contenido de la proteína bruta y digestibilidad de la mayoría de las especies analizadas, aspecto característico de la familia leguminosas a la que pertenecen (ROCHO *et al.*, 2004; PORQUEDDU & GONZÁLEZ, 2006). En general, presentan mayor proteína y digestibilidad las especies del género *Vicia* y *Lathyrus*, y *T. cherleri* presentó un valor nutritivo bastante mediocre, resultado similar al encontrado por ROBLES *et al.* (2015) en el espacio natural de Sierra Nevada.

Capacidad antioxidante. La Figura 10 muestra diferente respuesta de la AAT entre los distintos géneros. Los valores más bajos fueron en *Lens* y *Lathyrus* y más elevados en *Trifolium*; concretamente en *T. cherleri*, seguido de *M. rigidula* y *L. angustifolius*.

En relación a los antioxidantes enzimáticos, la actividad CAT fue más alta en el género *Vicia*, seguido de *Medicago*, y el más bajo el género *Trifolium*. La

especie con mayor contenido fue *V. amphicarpa* y las de menor *M. polimorfa* y *L. cicera* (Figura 11). El género *Vicia* también mostró mayores niveles de GPX (especialmente *V. sativa*) y fue menor en *Lupinus* (Figura 11).

Respecto a los antioxidantes no enzimáticos, el contenido de fenoles del material fresco fue superior en *L. angustifolius*, seguido por el género *Vicia*. Concretamente, el mayor contenido se observó en *V. disperma*, seguido de *L. nigricans* y *T. scabrum*; mientras que el género *Medicago* mostró valores más bajos, destacando *M. minima* (Figura 12 a). Sin embargo, las medidas de fenoles en material seco muestran una respuesta casi inversa, el género *Lathyrus* el que alcanza mayores valores, seguido de *Vicia*, mientras *L. nigricans* es el más bajo. Por su parte, el contenido en *Lupinus* se reduce considerablemente (Figura 12 b). Se observa un incremento del contenido de fenoles en material seco entre 2 veces (*L. nigricans*) y 7,5 *Lathyrus* respecto al verde, probablemente por un efecto de concentración debido a la pérdida de agua. Estos resultados evidencian que el secado del material vegetal no lleva consigo la destrucción de los fenoles, a excepción de *Lupinus*, en el que se ha observado una reducción a la mitad del contenido de fenoles.

En relación a los flavonoides, tanto en material fresco como material secado a 60 °C, el mayor conteni-

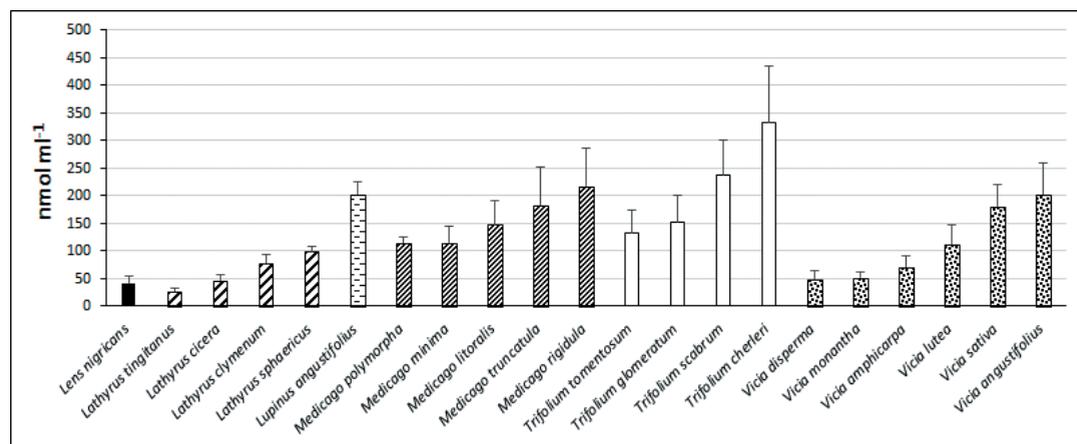


Figura 10. Actividad antioxidante total de planta completa, muestra en fresco

Figure 10. Total antioxidant activity of complete plant, fresh sample.

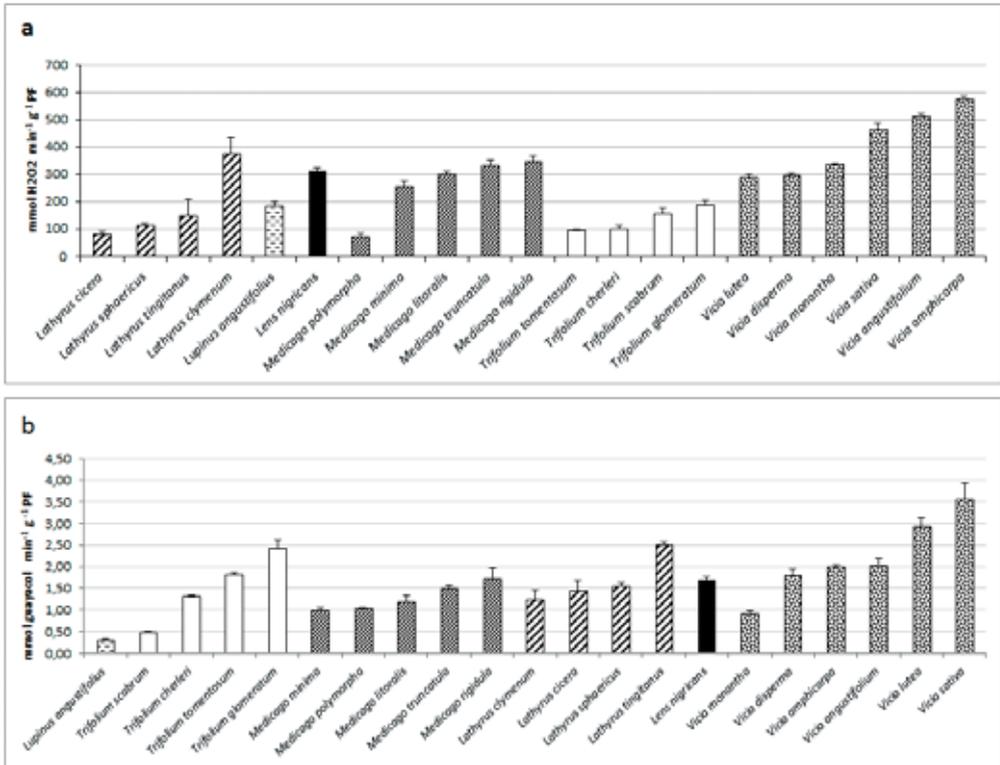


Figura 11. Actividades antioxidantes enzimáticas: a) catalasa (CAT) y b) guayacol peroxidasa (GPX) en planta completa, extractos de material fresco (PF).

Figure 11. Enzymatic antioxidant activities: a) catalase (CAT) and b) guaiacol peroxidase (GPX) in the whole plant, extracts of fresh material (PF).

do se encontró en los géneros *Lathyrus* y *Vicia*, y el más bajo se observó en el género *Medicago* y *Trifolium* (Figura 13 a y b). La especie *V. lutea* mostró el mayor contenido en flavonoides en material fresco, le sigue *L. cicera* y *L. sphaericus*. Al igual que se observó para los fenoles, el contenido de flavonoides se incrementaba en material seco respecto al fresco, en una proporción de 2 a 4 veces, según la especie. Respecto a la concentración de los flavonoides en material seco, los resultados sugieren que estos compuestos son resistentes a las altas temperaturas, tal y como SALVATORE *et al.* (2005) han observado en plantas silvestres hervidas.

El análisis comparativo del material en fresco de las actividades enzimáticas (CAT y GPX), el contenido de fenoles, flavonoides y los datos de AAT,

muestran algunas discrepancias. Así el género *Vicia* presenta valores mayores de CAT, GPX y Flavonoides, mientras sus AAT son menores, sin embargo, el género *Trifolium*, es elevado en AAT, mientras muestra niveles intermedios en fenoles, flavonoides y GPX, y bajos en CAT. Estas discrepancias pueden explicarse por la complejidad de los antioxidantes presentes en vegetales y su distinta contribución a la AAT, que puede variar dependiendo del género y de la especie. Existen muchas referencias en la literatura que correlacionan el contenido de fenoles con la AAT, sin embargo también se han descrito discrepancias (VITALINI *et al.*, 2006; PASTOR-CAVADA *et al.*, 2009). Otros antioxidantes como el ascorbato, glutatión, úrico, tocoferol, etc., podrían contribuir a la capacidad antioxidante total, sin embargo, no han sido analizados en este estudio

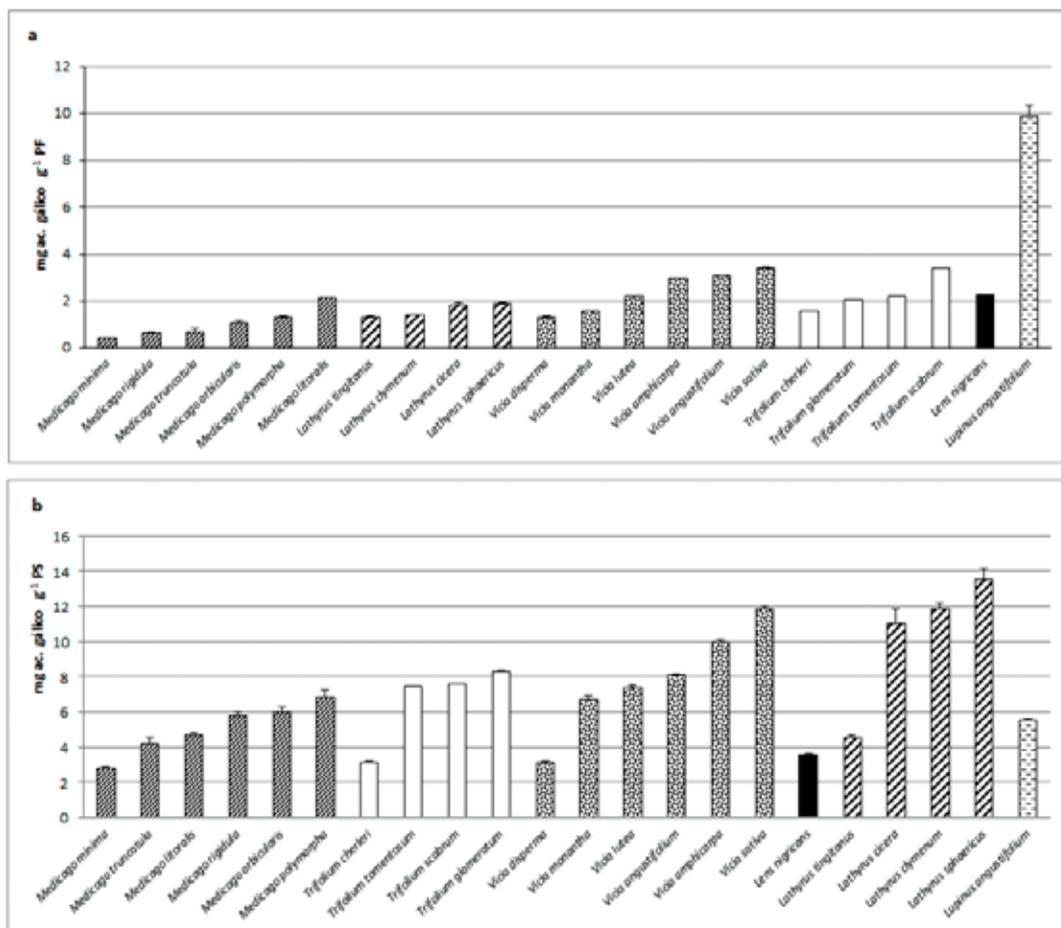


Figura 12. Fenoles totales en planta completa: a) extractos obtenidos en material fresco y b) en material seco (PS)

Figure 12. Total phenols in complete plant: a) extracts obtained in fresh material and b) in dry material (PS).

Los estudios de material fresco y seco de fenoles y flavonoides, nos han permitido establecer que el contenido de antioxidantes analizados no se reduce por efecto del secado de material, por el contrario, se incrementa el contenido de estos compuestos por efecto de concentración por pérdida de agua en el material seco, aspecto de gran interés en los forrajes que se henifican.

Ensayos de siembra y producción de semillas

En este trabajo se muestran los resultados de producción de forraje y semilla de Granada de 2013/14 y de 2015/16, y se comparan con los resultados de

Lanjarón y Soportújar de 2013/14 y 2014/15 (RAMOS-FONT *et al.*, 2019).

Los análisis de suelos realizados en 2013 indican que el suelo de Soportújar es el más fértil, probablemente debido a que fue un parque de noche de ganado. Ello se refleja en su mayor capacidad de intercambio catiónico, contenido en fósforo, materia orgánica, nitrógeno y potasio (Tabla 4), y por tanto es más idóneo para las siembras. Por otro lado, se analizaron los suelos de Lanjarón al final del proyecto (julio de 2016), y si comparamos con 2013, se aprecia que los manejados con redileo destacan por los importantes

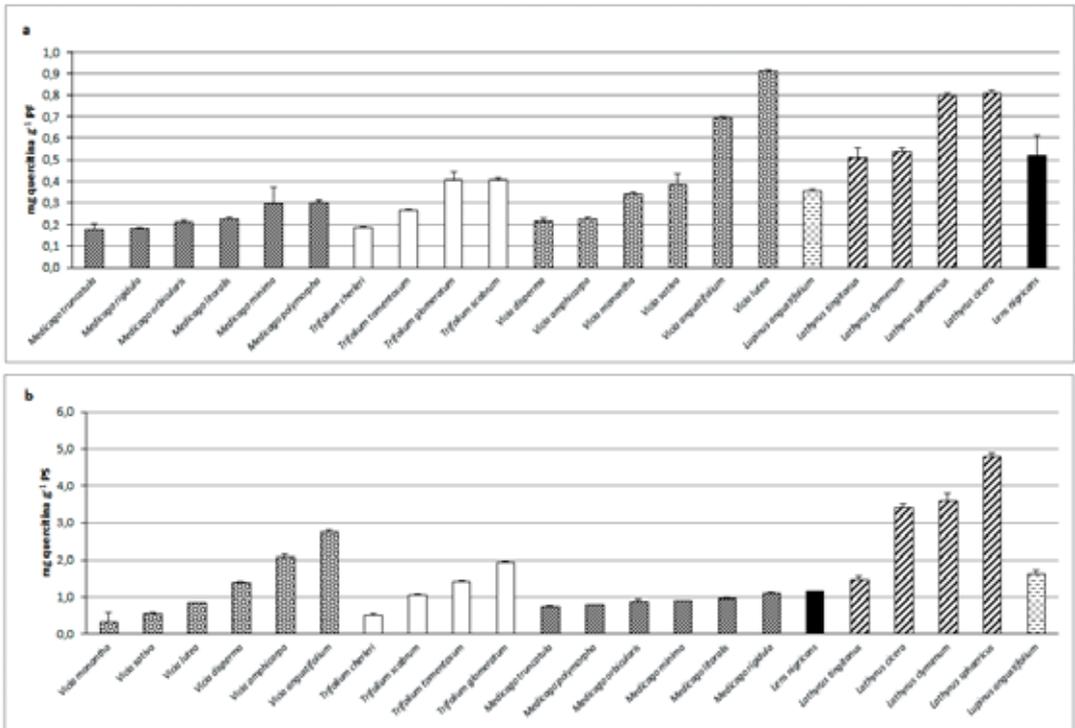


Figura 13. Flavonoides en planta completa: a) extractos obtenidos en material fresco y b) en material seco (PS).
Figure 13. Flavonoids in complete plant: a) extracts obtained in fresh material and b) in dry material (PS).

incrementos en: capacidad de intercambio catiónico (13,69 meq/100g), fósforo asimilable (17,33 p.p.m.), materia orgánica oxidable (4,33%), potasio asimilable (430 p.p.m.) y pH (7,0). Esto demostraría la eficacia del redileo en la mejora de la fertilidad del suelo.

En todas las especies las producciones de forraje y semillas fueron muy superiores en Granada (Forraje: hasta 35.225 kg MS ha⁻¹; semillas: hasta 9.900 kg ha⁻¹) respecto a Lanjarón y Soportújar (Tabla 5; Figuras 14 a 17) debido al apoyo con riego. De las dos localidades situadas en terrenos forestales, Soportújar presentó mayores producciones que Lanjarón, favorecida por la mayor precipitación y mayor fertilidad de suelo (ver Tabla 4).

En relación a la producción de forraje en 2013/14, en Granada (Tabla 5) se obtuvo una elevada producción del género *Vicia* (excepto *V. lutea*), especialmente de *V. sativa*, pero también de *V. disperma*, *V. monantha* y *V. amphicarpa*. También destacan

las buenas producciones de *L. clymenum* y *L. tinctorius*. Respecto al género *Medicago*, la más productiva fue la mezcla de medicagos (*Medicago* spp.) (con dominio de *M. polymorpha*). El resto de especies tuvieron producciones muy escasas. *T. cheryli* y *L. angustifolius* no se instalaron, probablemente porque requieren sustratos ácidos. En cuanto a la producción de semillas en esta localidad, los datos fueron coherentes con la producción de forraje, siendo las especies de *Vicia* las más productivas (Tabla 5). Por pérdida de material, no se pudo cuantificar la semilla de los *Medicago*. Además, en las localidades situadas en terrenos forestales, Soportújar tuvo la mayor producción para *V. monantha* (7570 kg MS ha⁻¹ de forraje y 1234 kg ha⁻¹ de semilla) y las menores para *L. sphaericus*, *T. glomeratum* y *T. cheryli* (forraje: 265 a 375 kg MS ha⁻¹ y semilla: 21,6 a 66,7 kg ha⁻¹) (RAMOS-FONT *et al.*, 2019). Lanjarón registró las producciones más escasas de forraje, siendo las más productivas *V. monantha*, *L.*

cicera y *V. disperma* (> 400 kg MS ha⁻¹), mientras que la menos productiva fue *M. polymorpha* (45,9 kg MS ha⁻¹). Debido a la baja producción de forraje, no se pudo cosechar semilla para esta localidad (RAMOS-FONT *et al.*, 2019).

Para la campaña 2015/16, en Lanjarón las especies más productivas, en cuanto a forraje, fueron *V. monantha* y *V. disperma* (Figura 14), aunque fueron muy inferiores a las obtenidas por RAMOS-FONT *et al.* (2019) en la campaña de 2014/15 (alrededor de 1400 y 1300 kg MS ha⁻¹, respectivamente). En cuanto a los tratamientos, las parcelas con inóculo bacteriano presentaron una producción inferior respecto al control en *L. cicera* y *V. amphicarpa* o similar (resto de especies). Aparentemente, las micorrizas tuvieron un efecto negativo (*L. cicera*, *L. sphaericus* *T. cherleri*, *V. amphicarpa* y *V. monantha*) o neutro (resto de las especies). Estos datos contrastan con los registrados en 2014/15 (RA-

MOS-FONT *et al.*, 2019), que no mostraron efectos negativos significativos al aplicar al suelo micorrizas o rizobios. Existen ejemplos en la literatura que indican un mayor desarrollo de las plantas como consecuencia de la infección de micorrizas e inoculación de rizobios (SAIA *et al.*, 2014; BAREA *et al.*, 2005). Por otra parte, el tratamiento con redileo fue siempre mejor que redileo+ micorrizas, y sólo *M. rigidula*, *V. monantha* y *V. amphicarpa* superaron al tratamiento control. Sin embargo, en la campaña 2014/15 (RAMOS-FONT *et al.*, 2019), para la mayoría de las especies se encontró un efecto positivo del redileo, tanto con o sin micorrizas. La producción de semillas fue muy escasa (Figura 15), debido probablemente a las bajas precipitaciones que dificultaron el desarrollo de las plantas y frutos. Tampoco se observaron efectos claros de los inóculos bacterianos o las micorrizas sobre la producción, coincidiendo con los resultados obtenidos en la campaña 2014/15 (RAMOS-FONT *et al.*, 2019).

Variables	Granada	Lanjarón	Soportújar
Caliza activa (%)	1,85	0,35	0,30
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100g)	10,09	12,00	14,78
Carbonatos (%)	8,0	1,5	2,3
Clasificación	Franco	Franco arenoso	Franco arenoso
Cobre (mg kg ⁻¹ de suelo)	3	1	1
Fósforo asimilable (p.p.m.)	8	ND	34
Hierro (mg kg ⁻¹ de suelo)	6	13	29
Magnesio de cambio (meq/100g)	1,98	1,97	2,08
Manganeso (mg kg ⁻¹ de suelo)	4	13	14
Materia orgánica oxidable (%)	1,30	2,98	3,70
Nitrógeno total (%)	0,092	0,171	0,202
pH 1/2'5	7,5	6,3	5,9
pH en CIK	7,8	6,4	6
Potasio asimilable (p.p.m.)	168	178	550
Prueba previa salinidad (mmhos cm ⁻¹)	0,22	0,17	0,28
Sodio de cambio (meq 100g ⁻¹)	0,45	0,51	0,42
Textura arcilla (%)	12,4	11,3	11,78
Textura arena (%)	49,1	55,1	54,6
Textura limo (%)	38,5	33,6	33,7
Zinc (mg kg ⁻¹ de suelo)	2	2	4

Tabla 4. Resultados de los análisis de suelos de las tres zonas de siembra (año 2013). En negrita se destacan los parámetros de fertilidad más importantes.

Table 4. Results of the soils analysis for the three seeding areas (2013 year). Bold indicates the main parameters of fertility.

Especies	Forraje		Semilla	
	Media	ES	Media	ES
<i>Lathyrus cicera</i>	1.301	450	474	180
<i>L. clymenum</i>	5.365	1801	1.637	611
<i>L. sphaericus</i>	364	149	145	65
<i>L. tingitanus</i>	4.461	1559	1.057	401
<i>Lens nigricans</i>	5	5	2	2
<i>Lotus ornithopodioides</i>	250	250	-	1
<i>Medicago spp.</i>	9.027	2094	-	440
<i>M. arabica</i>	2.665	47	-	1722
<i>M. minima</i>	1.755	1597	-	107
<i>M. orbicularis</i>	1.650	417	-	914
<i>M. polymorpha</i>	1.649	483	-	2069
<i>M. rigidula</i>	1.102	566	-	105
<i>Trifolium cherleri</i>	0	0	-	14
<i>T. glomeratum</i>	4	3	2	70
<i>T. scabrum</i>	63	38	-	28
<i>T. tomentosum</i>	719	360	-	34
<i>Vicia amphicarpa</i>	12.180	1965	2.562	18
<i>V. disperma</i>	12.227	4416	3.835	12
<i>V. lutea</i>	1.117	410	335	65
<i>V. monantha</i>	12.922	2643	3.713	177
<i>V. sativa</i>	35.225	4511	9.912	707

Tabla 5. Datos de producción de forraje (kg MS ha⁻¹) y semilla (kg ha⁻¹) en 2013 en la localidad de Granada (IFAPA- Camino de Purchil).
Table 5. Forage (kg DM ha⁻¹) and seed yield (kg ha⁻¹) in 2013 at Granada (IFAPA- Camino de Purchil).

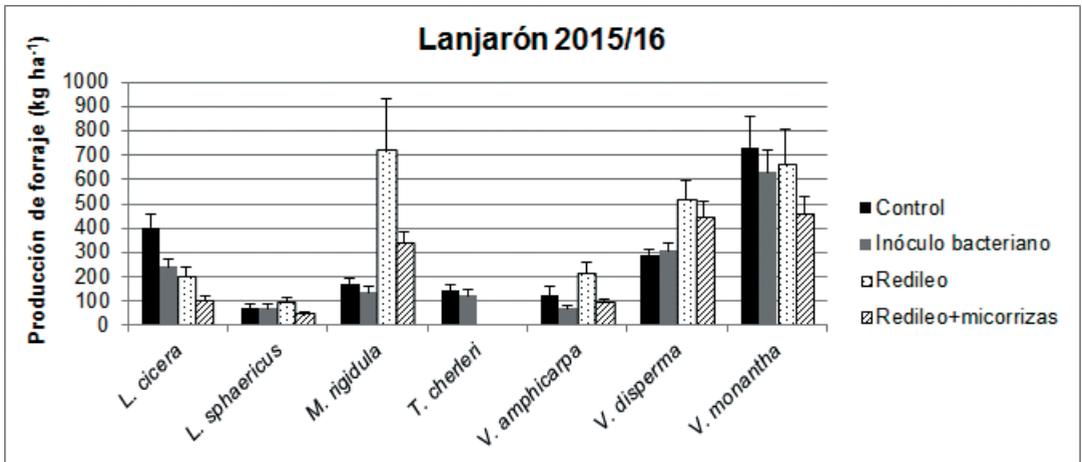


Figura 14. Producción de forraje en Lanjarón de 7 especies de leguminosas silvestres. Cuatro tratamientos: i) control, ii) inóculo bacteriano, iii) redileo, iv) redileo + micorrizas. Valores medios y barras de error estándar.

Figure 14. Forage yield in Lanjarón of 7 wild legume species. Four treatments: i) control, ii) bacterial inoculum, iii) redileo, iv) redileo + mycorrhizae. Mean values and standard error bars.

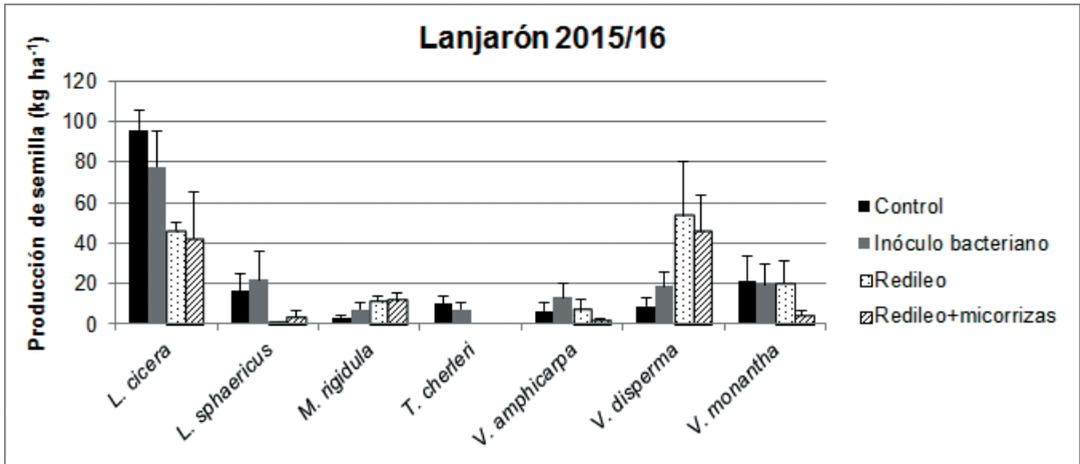


Figura 15. Producción de semilla en Lanjarón de 7 especies de leguminosas silvestres. Cuatro tratamientos: i) control, ii) inóculo bacteriano, iii) redileo, iv) redileo + micorrizas. Valores medios y barras de error estándar.

Figure 15. Seed yield in Lanjarón of 7 wild legume species. Four treatments: i) control, ii) bacterial inoculum, iii) redileo, iv) redileo + mycorrhizae. Mean values and standard error bars.

En Soportújar (2015/16) la producción de forraje (Figura 16) fue muy superior a la de Lanjarón, siendo las especies más productivas *V. monantha*, *V. amphicarpa* y *V. disperma*, respuesta similar a la encontrada por RAMOS-FONT *et al.* (2019) un año anterior. Respecto al tratamiento con micorrizas, las anteriores especies mostraron una respuesta negativa y *L. cicera* incrementó su producción. Como en Lanjarón, la producción de semillas fue muy baja, siendo *V. amphicarpa* y *V. monantha* las más elevadas (Figura 17). Aunque, aparentemente no existen diferencias claras entre tratamientos.

Los resultados reflejan una baja producción de forraje y de semilla, probablemente debido a que los años de seguimiento fueron muy secos. Las enormes diferencias entre las distintas zonas de siembra (agrícolas y forestales) son debidas al aporte de riego (Granada), y dentro de las localidades forestales a las diferentes condiciones edafoclimáticas entre Lanjarón y Soportújar, mejores en esta última lo que determinó cosechas hasta más de 10 veces superiores a las de Lanjarón.

En líneas generales, y para el conjunto de las tres localidades sembradas, las dos especies más productivas fueron *V. monantha* y *V. disperma*. Sin embar-

go, también destacaron por su elevada producción *V. amphicarpa*, en Granada y Soportújar, y *V. sativa*, sólo en Granada. Aunque, en menor medida, hubo otras especies que presentaron unas producciones aceptables como *L. cicera* y *M. rigidula* (Lanjarón), *L. clymenum* (Granada y Soportújar) y *M. truncatula* (Soportújar).

En general, no hubo una respuesta clara ni uniforme de los distintos tratamientos de fertilización, aunque en Lanjarón el redileo fue el de mejor respuesta. Como todo ensayo de siembra, y más en terrenos forestales, sería conveniente continuar los ensayos de fertilización durante al menos algunos años más para poder extraer conclusiones definitivas sobre estos.

Estudio Microbiológico

Aislamiento de bacterias y Genotipado mediante RAPD fingerprinting RAPD. Un total de 288 cepas fueron aisladas del interior de los nódulos de las plantas en estudio. Concretamente, se aislaron 43 cepas de *V. amphicarpa*, 38 de *V. disperma*, 36 cepas de *L. sphaericus*, 40 de *L. cicera*, 42 cepas de *T. cherleri*, seis de *T. glomeratum* y 40 y 43 cepas del interior de los nódulos de *M. polymorpha* y *M. ri-*

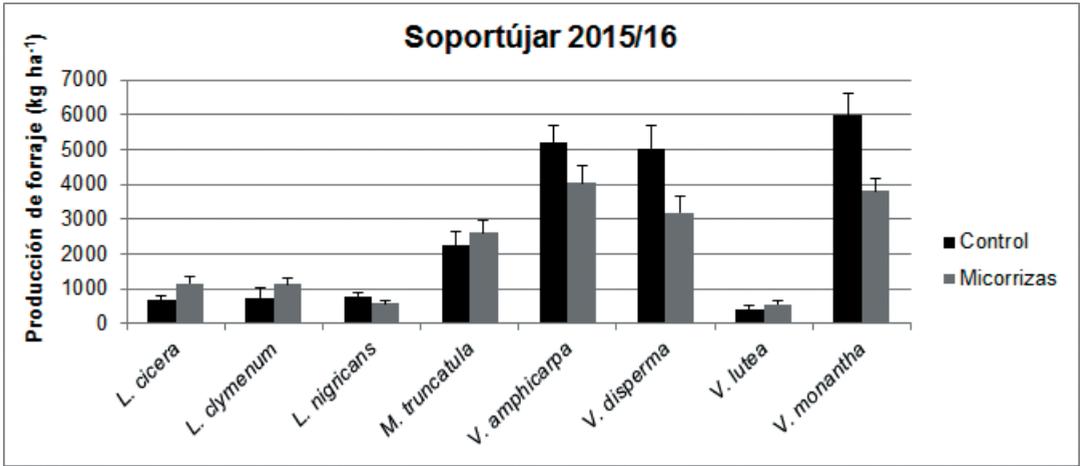


Figura 16. Producción de forraje en Soportújar de 8 especies de leguminosas silvestres. Dos tratamientos: i) control, ii) micorrizas. Valores medios y barras de error estándar.

Figure 16. Forage yield in Soportújar of 8 wild legume species. Two treatments: i) control, ii) mycorrhizae. Mean values and standard error bars.

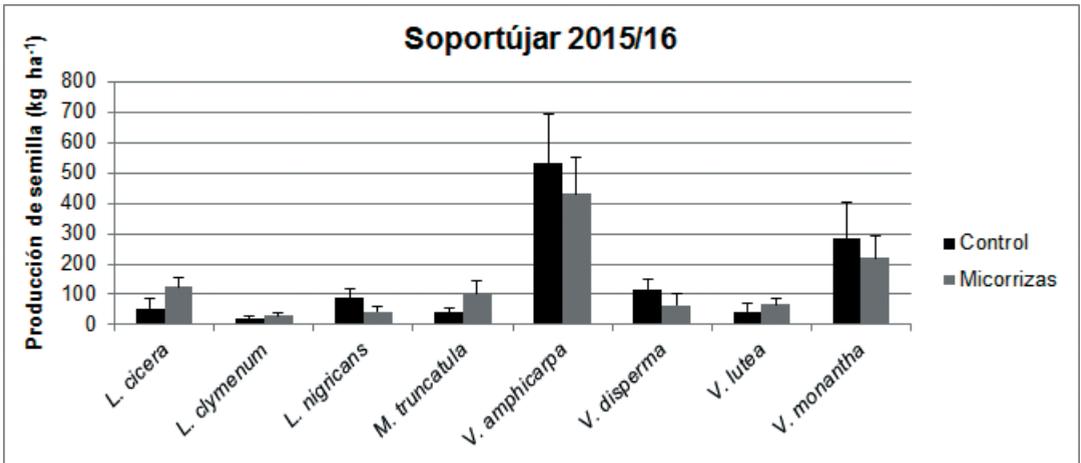


Figura 17. Producción de semilla en Soportújar de 8 especies de leguminosas silvestres. Dos tratamientos: i) control, ii) micorrizas. Valores medios y barras de error estándar.

Figure 17. Seed yield in Lanjarón of 8 wild legume species. Two treatments: i) control, ii) mycorrhizae. Mean values and standard error bars.

gudula, respectivamente. Se detectaron 80 perfiles RAPD diferentes con un coeficiente de correlación de Pearson inferior al 70 %, lo cual denota la gran diversidad genética de los aislados en estudio. Para los análisis taxonómicos, se seleccionó al menos una cepa aislada de cada hospedador como representante de cada perfil RAPD.

Secuenciación y análisis de los genes *rrs*, *recA*, *atpD*, *glnII* y *nodC*. Las secuencias del gen *rrs* de las cepas aisladas de los nódulos de los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* resultaron ser idénticas a las correspondientes a varias especies del grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum*. Por el contrario, las cepas aisladas del interior de los nódulos de

M. rigidula y *M. polymorpha* mostraron secuencias con un 99 y 100% de identidad a aquellas de las especies *Sinorhizobium meliloti* y *S. medicae*. Sin embargo, dado que este gen mostró una elevada similitud con el de varias especies diferentes, fue necesario analizar además otros genes para lograr una identificación a nivel de especie.

La diversidad genética de las cepas aisladas de *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* resultó ser mayor que la de aquellas procedentes de los nódulos de *Medicago*. En efecto, mientras las primeras mostraron 14 y 16 tipos distintos de los genes *atpD* y *recA*, las cepas de *S. meliloti* tan solo estaban representadas por uno y tres grupos de dichos genes, respectivamente (Figura 18, Tabla 6).

Para todos los genes esenciales analizados, las cepas aisladas de *Medicago* mostraron una similitud superior al 99 % a los correspondientes de *S. meliloti*, la especie más próximamente relacionada (Figura18), corroborando los hallazgos obtenidos para el gen *rrs*. Por lo tanto, los resultados obtenidos tras el análisis de todos los genes conducen a la identificación de todas las cepas aisladas de los nódulos de *M. polymorpha* y *M. rigidula* como *S. meliloti*. Se trata de un simbiote habitual de diversas especies de *Medicago*, pues ha sido previamente aislado de nódulos de *M. sativa* (YAN *et al.* 2000), *M. truncatula* (MHADHBI *et al.* 2005), e incluso

de *M. polymorpha* y *M. rigidula* (BROCKWELL & HOLLIDAY 1988), entre otras.

Por el contrario, ninguna de las cepas bacterianas aisladas de *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* pudo ser identificada a nivel de especie dada la baja similitud observada con respecto a especies ya conocidas del género *Rhizobium*, para cualquiera de los genes en estudio. Es de destacar que algunas cepas mostraron valores de similitud por debajo incluso del límite actual para la descripción de nuevas especies (97%), pudiendo considerarse por lo tanto posibles nuevas especies del género *Rhizobium*. Otras en cambio resultaron ser más similares pero a diferentes especies según el gen considerado, y por ende, deberían ser analizadas con mayor profundidad en un futuro para su clasificación a nivel de especie (VILLADAS *et al.* 2017).

Análisis del gen de nodulación *nodC*. El gen *nodC* resultó ser el más diverso de todos los analizados ya que en estudios anteriores pudieron detectarse hasta 14 y 16 tipos diferentes de este gen en las cepas aisladas de las leguminosas pertenecientes a las tribus Trifolieae y Fabeae, respectivamente (VILLADAS *et al.* 2017). En consonancia con los resultados observados para los genes esenciales y el gen *rrs*, se detectó un menor número de tipos distintos del gen *nodC* en aquellas cepas bacterianas aisladas del género *Medicago* (ocho tipos, ver Tabla 6), si bien este

atpD	rrs	recA	nodC	Cepas representativas*
Tipo a	Tipo I	Tipo A	Tipo 1	MP1 (P: 1; R: 1)
			Tipo 2	MP11 (P: 2; R: 2)
			Tipo 3	MP32 (P: 3; R: 4)
			Tipo 4	MP15 (P: 2)
			Tipo 5	MP30 (P: 1; R: 2)
			Tipo 6	MR43 (R: 1)
	Tipo B	Tipo 7	MP28 (P: 1)	
	Tipo II	Tipo C	Tipo 8	MP16 (P: 2)

* El número entre paréntesis indica el número de cepas representantes que muestra cada tipo de gen. P: Representantes RAPD de las cepas aisladas del interior de nódulos de *Medicago polymorpha*; R: Representantes RAPD de las cepas aisladas del interior de nódulos de *Medicago rigidula*.

Tabla 6. Tipos de los genes *rrs*, *atpD*, *recA* y *nodC* observados para las cepas aisladas del interior de nódulos radiculares de *M. polymorpha* y *M. rigidula*.

Table 6. Types *rrs*, *atpD*, *recA* of genes observed and *nodC* for strains isolated from the interior of root nodules of *M. polymorpha* and *M. rigidula*.

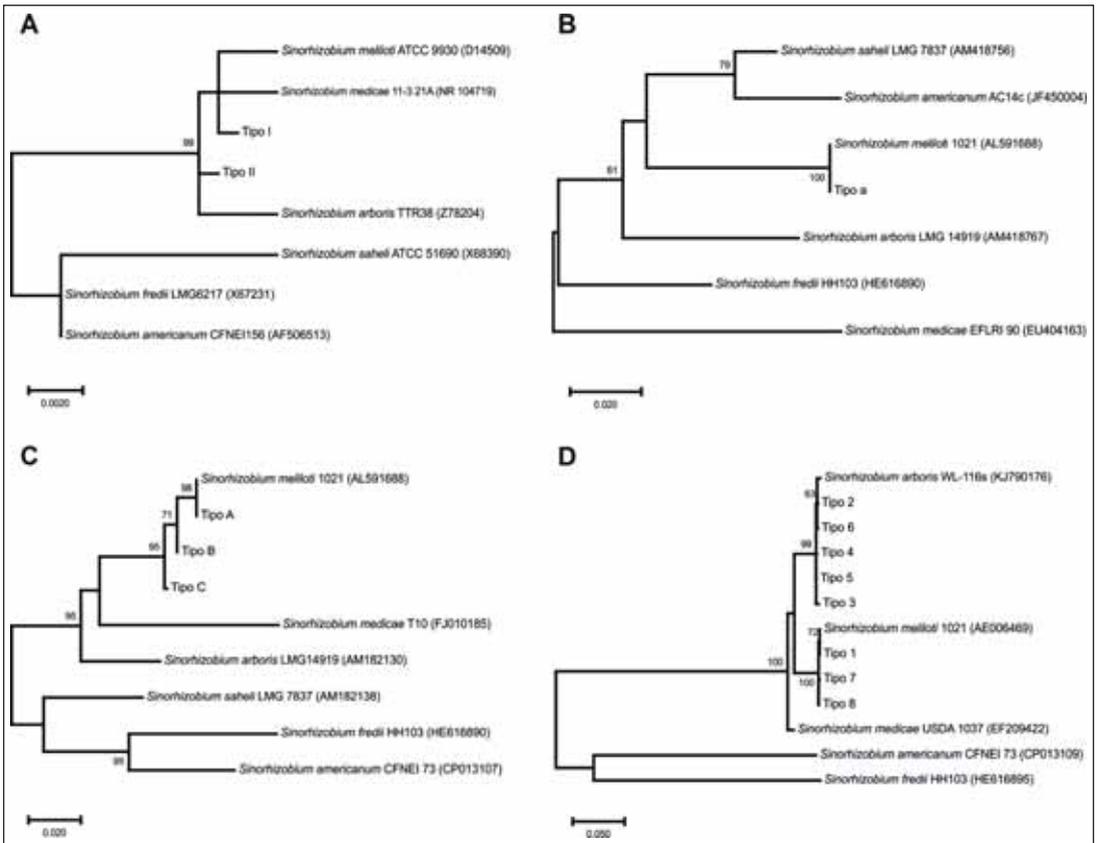


Figura 18. Figura X. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de los genes *rrs* (A), *atpD* (B), *recA* (C) y *nodC* (D) de las cepas estudiadas y de algunas especies del género *Sinorhizobium* muy relacionadas. Los valores de bootstrap se calcularon para 1000 réplicas.

Figure 18. Phylogenetic tree based on *rrs* (A), *atpD* (B), *recA* (C) and *nodC* (D) partial sequences showing the position of the studied strains and the closest related species of genus *Sinorhizobium*. Bootstrap values calculated for 1000 replications.

gen fue el que igualmente mostró una mayor diversidad. A diferencia de lo que ocurre con los genes esenciales, el gen *nodC* es habitualmente transferido de forma horizontal entre rizobios (VELÁZQUEZ *et al.* 2010), lo cual justifica el diferente nivel de diversificación observado para los distintos genes en estudio.

CONCLUSIONES

La prospección del territorio pone de manifiesto la aceptable oferta de leguminosas silvestres en el Es-

pacio Natural de Sierra Nevada susceptibles de ser utilizadas en planes de mejora y restauración ecológica de pastos y zonas degradadas. Al respecto, se pone a disposición de los gestores una detallada base de datos con los recursos pascícolas y fuentes semilleras del territorio.

El estudio microbiológico encontró una considerable diversidad de cepas bacterianas en los nódulos de las especies estudiadas, mayor en los aislados de *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* que en *Medicago*. Las cepas aisladas de los nódulos de los géneros *Vicia*, *Lathyrus* y *Trifolium* resultaron ser idénticas a va-

rias especies del grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum*, mientras que las de género *Medicago* se identificaron con *Sinorhizobium meliloti* y *S. medicae*.

Respecto a las técnicas pregerminativas, la escarificación mecánica y los tratamientos con agua caliente resultaron ser las técnicas más efectivas para mejorar la germinación de las especies estudiadas.

Destacan por su valor nutritivo los géneros *Vicia* y *Lathyrus*, de alta digestibilidad y contenido en proteína bruta. Respecto a los antioxidantes, debido a complejidad de los mismos, existe gran variación entre especies dependiendo del tipo de análisis que se trate. Aunque, en general género *Vicia* mostró mayor capacidad antioxidante. Se observa que en el material seco se incrementa sensiblemente el contenido de fenoles y flavonoides, lo que podría tener gran importancia de cara a la eventual henificación de los forrajes.

En relación a la producción, también los géneros *Vicia* y *Lathyrus* fueron los más productivos, sobre todo *V. monantha* y *V. disperma*, por lo que se recomiendan para emplearlas en actuaciones técnicas de mejora de pastos. También son de interés *V. amphicarpa* y (en condiciones de cultivo semillero) y *V.*

sativa. Del género *Lathyrus* debemos señalar a *L. cicera* y *L. clymenum*.

Respecto a actuaciones de fertilización, a pesar de que la respuesta que encontramos en nuestros ensayos no fue siempre uniforme, podemos concluir que, en general, tanto técnica como económicamente, la práctica de redileo fue la más positiva.

Desde el punto de vista práctico, aplicable a los planes de restauración ecológica, proponemos la escarificación de las semillas con trilladora y la práctica de redileo, como técnicas para lograr un mayor establecimiento de las leguminosas en campo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Organismo Autónomo Parques Nacionales la financiación del proyecto 748/2012. De forma especial: a los gestores del Espacio Nacional de Sierra Nevada por el apoyo que nos prestaron en todo momento; a D. Francisco Manuel Cabeza Arcas por su colaboración como alumno del Curso UNESCO impartido en la EEZ-CSIC y a D. Baltasar Pozo (pastor y ganadero en el perímetro de Lanjarón) por su gran conocimiento pastoral, aportaciones y ayuda en labores de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGEL, P. J.; PATON, C. J. 1999. Overcoming legume hardseededness. En: Loch D.S. y Ferguson J.E. (eds.) Forage Seed Production, Volume 2: Tropical and subtropical species. pp. 247-259. CAB International. Oxford.
- BAREA, J.M.; POZO, M. J.; AZCON, R.; AZCON-AGUILAR, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal Experimental Botany* 56: 1761-1778.
- BASKIN, C.C. 2003. Breaking physical dormancy in seeds-focussing on the lens. *New Phytologist* 158: 229-32.
- BERINGER, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 128-163.
- BLANCA, G.; CABEZUDO, B.; CUETO, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C.; MORALES-TORRES, C. (eds.). 2009. Flora Vascular de Andalucía Oriental, Vol. 2. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla.
- BROCKWELL, J.; HOLLIDAY, R.A. 1988. Symbiotic characteristics of a Rhizobium-specific annual medic, *Medicago rigidula* (L.) All. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 593-600.
- CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; BACH, A. 2016. Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Sub-productos fibrosos húmedos. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid.
- CAN, E.; ÇELIKTAŞ, N.; HATIPOĞLU, R.; AVCI, S. 2009. Breaking seed dormancy of some annual *Medicago* and *Trifolium* species by different treatments. *Turkish Journal of Field Crops* 14: 72-78.
- COBO-DÍAZ, J.F.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.J.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; TORO, N.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. (2014) The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar (sierranevadense). *Systematic and Applied Microbiology* 37:177-185.
- DE BLAS, C.; MATEOS, G.G.; GARCÍA-REBOLLAR P. 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (3ª edición). FEDNA. Madrid.
- DEMARQUILLY, C.; ANDRIEU, J. 1992. Composition chimique, digestibilité et ingestibilité des fourrages européens exploités en vert. *INRA Productions Animales* 5: 213-221.
- DURÁN, D.; REY, L.; SÁNCHEZ-CAÑIZARES, C.; NAVARRO, A.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGUESO, T. 2013. Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 128-136.
- GAUNT, M.W.; TURNER, S.L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S.A.; YOUNG, J.W.P. 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2037-2058.
- GOMEZ-ZOTANO, J.; MORENO-SANCHEZ, J. J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, F. 2005. El incendio de Sierra Nevada (22-24 de septiembre de 2005). Una catástrofe ecológica. *Cuadernos Geograficos* 37: 205-214.
- JAMES, J.J.; BOYD C.S.; SVEJCAR, T. 2013. Seed and Seedling Ecology Research to Enhance Restoration Outcomes. *Rangeland Ecology and Management* 66:115-116.
- KHAEF, N.; SADEGHI, H.; TAGHVAEI, M. 2011. Effects of new strategies for breaking dormancy of two annual medics (*Medicago scutellata* and *Medicago polymorpha*). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 11: 626-632.

- LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. 2001. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981-993.
- LEIGH, G.J. 2002. Nitrogen fixation at the millennium. Elsevier Science, London.
- MARTIN-ROSSET, W.; ANDRIEU, J.; JESTIN, M.; MACHEBOEUF, D.; ANDUEZA, D. 2012 Prediction of organic matter digestibility of forages in horses using different chemical, biological and physical methods. In: Saastamoinen *et al.* (eds.) Forages and grazing in horse nutrition. Forages and grazing in horse nutrition, Vol 132. Wageningen Academic Publishers. Wageningen.
- MHADHBI, H.; JEBARA, M.; LIMAM, F.; HUGUET, T.; AOUANI, M.E. 2005. Interaction between *Medicago truncatula* lines and *Sinorhizobium meliloti* strains for symbiotic efficiency and nodule antioxidant activities. *Physiologia Plantarum* 124: 4-11.
- OLEA, L.; DEL POZO, J.; ANARTE, J.M.; PAREDES, J. 1989. Eliminación de la dureza seminal en las leguminosas pratenses anuales autóctonas. En: SEEP y SPPF (eds.) Actas de la II Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes. pp. 205-212. SEEP. Badajoz y Elvas.
- PASTOR-CAVADA, E. JUAN, R.; PASTOR, J.E.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. 2009 Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain LWT. *Food Science Technol* 42: 705-709.
- PORQUEDDU, C.; GONZÁLEZ, F. 2006. Role and potential of annual pasture legumes in Mediterranean farming systems. *Pastos* 36: 125-142.
- QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J.; DINET, T.; BRUNET, C.; LUYCK, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal Ethnopharmacology* 72: 161-171.
- RAMOS-FONT, M.E.; ROBLES, A.B.; TOGNETTI, M.J.; GONZÁLEZ-REBOLLAR, J. L. 2016. Métodos para la reducción de la dureza seminal en leguminosas silvestres del espacio natural Sierra Nevada. En: (eds.) Báez M.D *et al.* Innovación Sostenible: Hacia una Agricultura de Respuesta al Cambio Climático. pp. 22-26. SEEP. Lugo.
- RAMOS-FONT, M.E.; TOGNETTI, M.J.; GONZÁLEZ-REBOLLAR, J.L.; ROBLES, A.B. 2019. Potential of wild annual legumes for mountain pasture restoration at two silvopastoral sites in southern Spain: promising species and soil-improvement techniques. *Agroforestry systems*. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0340-5>
- RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. 2007. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Letters in Applied Microbiology* 44: 181-187.
- ROBLES, A.B.; RAMOS, M.E.; CABEZA, F.M.; DELGADO, F.; GONZÁLEZ-REBOLLAR, J. L. 2015 Leguminosas herbáceas en la restauración forestal de zonas incendiadas del macizo de Sierra Nevada: producción y calidad. En: Cifre J. *et al.* (eds.) Pastos y forrajes del siglo XXI. pp 129-136. SEEP. Palma de Mallorca.
- ROCHON, J. J.; DOYLE, C. J.; GREEF, J. M.; HOPKINS, A.; MOLLE, G.; SITZIA M.; SCHOLEFIELD, D.Y.; SMITH, C. J. 2004. Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass and Forage Science* 59: 197-214.
- SAIA, S.; AMATO, G.; FREND A.S.; GIAMBALVO, D.; RUISI, P. 2014. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production and nitrogen fixation of berseem. *PlosOne* 9: e9073.
- SALVATORE, S.; PELLEGRINI, N.; BRENN A, O. V.; DEL RIO, D.; FRASCA, G.; BRIGHENTI, F.; TUMINO, R. 2005. Antioxidant characterization of some Sicilian edible wild greens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9465 -9471.

- SAN MIGUEL, A. 2001. Pastos naturales españoles. Caracterización, aprovechamiento y posibilidades de mejora. Coedición Fundación Conde del Valle de Salazar y Mundi-Prensa. Madrid.
- SANCHEZ-BEL, P.; EGEA, I.; SERRANO, M.; ROMOJARO, A.; PRETEL, M.T. 2012. Obtaining and storage of ready-to-use segments from traditional orange obtained by enzymatic peeling. *Food Science and Technology International* 18: 63-72.
- SANDALIO L.M, DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.; DEL RÍO, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115- 2126.
- SERIDA 2018. Laboratorio de Nutrición Animal. <http://www.serida.org/nutricionanimal.php>.
- TORO, N.; VILLADAS, P.J.; MOLINA-SÁNCHEZ, M.D.; NAVARRO-GÓMEZ, P.; VINARDELL, J.M.; CUESTA-BERRIO, L.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M.A. 2017. The underlying process of early ecological and genetic differentiation in a facultative mutualistic *Sinorhizobium meliloti* population. *Scientific Reports* 7: 675.
- VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; RIVAS, R.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. 2010. Bacteria Involved in Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis: Current Taxonomic Perspective. En: Khan, M.S.; Musarrat, J.y Zaidi, A.; (eds.) *Microbes for Legume Improvement*. pp.1-25. Springer-Verlag, Viena.
- VILLADAS, P.J.; LASA, A.V.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; TORO, N.; VELÁZQUEZ E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. 2017. Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountains firewall in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology* 40: 92-101.
- VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 29-54.
- YAN, A.M.; WANG, E.T.; KAN, F.L.; TAN, Z.Y.; SUI, X.H.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W.X. 2000. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1887-1891.
- VITALINI, S.; GRANDE, S.; VISIOLI, F.; AGRADI, E.; FICO, G.; TOME, F. 2006. Antioxidant activity of wild plants collected in Valsesia, an alpine region of Northern Italy. *Phytotherapy Research* 20: 576-580.

