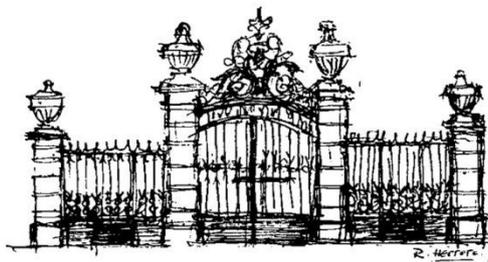


UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS



**BIOFORTIFICACIÓN AGRONÓMICA CON SELENIO Y ZINC
SOBRE GUISANTE FORRAJERO (*PISUM SATIVUM* L.) BAJO
CONDICIONES DE SECANO MEDITERRÁNEAS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Pablo Riaño Salas

Badajoz, enero 2019

TRABAJO FIN DE MÁSTER
BIOFORTIFICACIÓN AGRONÓMICA CON SELENIO Y ZINC
SOBRE GUISANTE FORRAJERO (*PISUM SATIVUM* L.) BAJO
CONDICIONES DE SECANO MEDITERRÁNEAS

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTOR: Pablo Riaño Salas

TUTORA: M^a José Poblaciones Suárez-Bárcena

Tutor

Fdo:.....

Convocatoria:

ÍNDICE

| | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. RESUMEN | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2.1. El selenio y el zinc | 4 |
| 2.1.1. El selenio y el zinc en el suelo | 4 |
| 2.2. Importancia del Se y del Zn en plantas, animales y humanos | 7 |
| 2.2.1. Plantas: absorción, metabolismo y funciones de ambos | 7 |
| 2.2.2. Animales (necesidades y problemas de su deficiencia) | 9 |
| 2.2.3. Ser humano: necesidades, problemas de su deficiencia y cuantificación de carencias en el mundo. | 10 |
| 2.3. Estrategias de remediación | 12 |
| 2.3.1. Diversificación dietética | 12 |
| 2.3.2. Fortificación de alimentos | 13 |
| 2.3.3. Biofortificación de los cultivos | 13 |
| 2.4. El guisante forrajero: origen e importancia | 15 |
| 2.4.1. Características, ecología y necesidades edafo-climáticas | 17 |
| 2.4.2. Composición nutricional | 18 |
| 2.4.3. Experiencias previas de biofortificación en guisante | 19 |
| 3. OBJETIVOS..... | 22 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 24 |
| 4.1. Localización del proyecto..... | 24 |
| 4.2. Determinación edafoclimática del ensayo | 24 |
| 4.3. Material utilizado y técnicas culturales | 27 |
| 4.4. Diseño experimental | 27 |
| 4.5. Determinaciones realizadas | 29 |
| 4.5.1. Rendimiento..... | 29 |
| 4.5.2. Contenido en proteína | 30 |
| 4.5.3. Fibra neutro detergente | 30 |
| 4.5.4. Fibra ácido detergente..... | 31 |
| 4.5.5. Contenido en lignina | 32 |
| 4.5.6. Peso de cenizas | 32 |
| 4.5.7. Contenido de nutrientes en el forraje | 32 |
| 4.6. Análisis estadístico | 33 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 35 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1. Condiciones climáticas | 35 |
| 5.2. Características edafológicas de la parcela | 37 |
| 5.3. Rendimiento en biomasa | 39 |
| 5.4. Contenido proteico y contenido de cenizas | 43 |
| 5.5. Fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y contenido en lignina (LAD) | 46 |
| 5.6. Contenido en nutrientes | 48 |
| 5.7. Viabilidad económica de los tratamientos: Se foliar y Zn Suelo, Foliar y Suelo+Foliar | 55 |
| 6. CONCLUSIONES | 61 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 63 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TABLA 2.1. Formas de Se en suelo..... | 5 |
| TABLA 2.2. Concentraciones de Zn ligada a superficie de intercambio catiónico en relación con el pH | 7 |
| TABLA 2.3. Concentración de Selenio según especie de planta | 8 |
| TABLA 2.4. Concentración de Zn en distintas especies de plantas..... | 9 |
| TABLA 2.5. Asignaciones dietéticas recomendadas revisadas (RDA) para el zinc por etapa de vida y tipo de dieta según lo sugerido por IZiNG | 12 |
| TABLA 2.6. Superficie, producción y rendimiento del guisante seco en el año 2016 | 16 |
| TABLA 2.7. Composición nutricional (%) de la semilla del guisante..... | 19 |
| TABLA 4.1. Datos climáticos de la estación “Bercial” | 25 |
| TABLA 5.1. Valores de los parámetros edafológicos de la zona de ensayo..... | 38 |
| TABLA 5.2. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) del rendimiento de biomasa del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas..... | 39 |
| TABLA 5.3. Efecto de la aplicación de Se y de Zn sobre el rendimiento de biomasa de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas..... | 40 |
| TABLA 5.4. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) del contenido de proteína y cantidad de cenizas del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas..... | 43 |
| TABLA 5.5. Efecto de la aplicación de Se y de Zn sobre el contenido de proteína (%) y contenido de cenizas (%) de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas. ... | 44 |
| TABLA 5.6. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) de la fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y contenido de lignina del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas. | 46 |
| TABLA 5.7. Efecto de la aplicación de Se y de Zn sobre la fibra neutro detergente (%), fibra ácido detergente (%) y contenido en lignina (%) de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas. | 46 |
| TABLA 5.8. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) del rendimiento de biomasa, contenido de proteína y cantidad de cenizas del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas..... | 48 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLA 5.9. Efectos de la aplicación de Se y de Zn sobre la concentración de Ca, Fe, Mg, Se y Zn por kg de forraje (M.S.) en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas. | 50 |
| TABLA 5.10. Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de Se..... | 56 |
| TABLA 5.11. Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de Zn | 58 |
| TABLA 5.12. Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de Se y Zn de forma conjunta | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| FIGURA 4.1. Vista aérea de la finca. Fuente: Google Maps | 24 |
| FIGURA 4.2. Esquema del diseño del ensayo a nivel de campo. | 29 |
| FIGURA 5.1. Datos de precipitación (mm), temperatura media (°C), temperatura máxima (°C) y temperatura mínima (°C) durante el curso 2017/18..... | 35 |
| FIGURA 5.2. Datos medios de precipitación (mm), temperatura media (°C), temperatura máxima (°C) y temperatura mínima (°C) desde junio 1998..... | 36 |
| FIGURA 5.3. Efecto de la interacción de Se y de Zn sobre el rendimiento de biomasa de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas..... | 42 |
| FIGURA 5.4. Efecto de la interacción de Se y de Zn sobre el rendimiento de biomasa de guisante en el año agrícola 2017/ 2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas..... | 45 |
| FIGURA 5.5. Efecto de la interacción aplicación de Se y de Zn sobre la concentración de Se ($\mu\text{g Se kg}^{-1}$) y de Zn (mg Zn kg^{-1}) en el forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas. | 52 |

1. RESUMEN

1. RESUMEN

El Selenio (Se) y el Zinc (Zn) son dos minerales esenciales para animales y humanos, sin embargo muchas veces la ingesta en los mismos es insuficiente, como consecuencia de que las plantas y los suelos son deficientes. Una ingesta pobre de Se da lugar a numerosas patologías como la del músculo blanco en ovino y bovino hepatitis dietética en porcino y la de Zn produce inapetencia, retraso en el crecimiento, disminución de la fertilidad, etc. Para paliar estas deficiencias, se diseñó un experimento en parcelas subdivididas con cuatro repeticiones sobre guisante forrajero (*Pisum sativum* L.) en el que la parcela principal fue la aplicación de Zn (no aplicación de Zn, aplicación de 50 kg de Zn ha⁻¹ al suelo, aplicación de 8 kg de Zn ha⁻¹ foliar y, por último, la aplicación combinada de Zn al suelo y foliar) y la subparcela la aplicación de Se (no aplicación de Se y aplicación foliar de 10 g Se ha⁻¹). Se estudió el rendimiento en biomasa, la calidad y la cantidad de nutrientes del forraje. El rendimiento en biomasa aumentó con la aplicación de Se un 9,3%, así como con la aplicación de Zn al suelo un 25% y la aplicación suelo + foliar un 22% observándose un efecto positivo en la aplicación combinada de ambos nutrientes. El contenido proteico disminuyó con la aplicación de Se un 2,9% y con la aplicación de Zn al suelo un 4,5%, sin embargo, aumentó con la aplicación de Zn vía foliar un 4,9%. Los contenidos de FND, FAD y LAD no se vieron afectados por ningún tratamiento. Respecto al contenido en nutrientes, el Ca no se vio influido, mientras que el Fe y el Mg disminuyeron con la aplicación de Zn. La concentración de Se aumentó a 206,6 µg Se kg⁻¹ cuando se aplicó este vía foliar respecto a 51,8 µg Se kg⁻¹ cuando no se aplicó. La concentración de Zn aumentó significativamente con la aplicación foliar y con la combinada suelo+foliar, alcanzando concentraciones de 96,95 y 86,93 mg Zn kg⁻¹, respectivamente. Teniendo en cuenta los rendimientos y los costes de aplicación, los tratamientos de Se, de Zn Suelo y Zn Suelo+Foliar, así como los tratamientos combinados de Se con Zn presentaron beneficio económico. Por tanto, la biofortificación agronómica con Se y Zn es una práctica realmente efectiva para paliar las deficiencias en la dieta del ganado debido a los bajos contenidos en Se y Zn biodisponible en los suelos de Centro-Oeste de la Península Ibérica, siendo positiva la aplicación conjunta.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El selenio y el zinc

A lo largo de la historia de la humanidad, la producción de alimentos ha ido evolucionando y, en los últimos años, se ha pasado de una demanda de producción a una demanda de la calidad de los productos producidos y son muchos los estudios encaminados a mejorar la calidad nutricional, organoléptica y sensorial de los alimentos de consumo humano y animal. Respecto a la nutrición, el ser humano necesita más de 22 elementos minerales (White y Broadley, 2005), muchos de ellos necesarios en pequeñas concentraciones, pero su importancia biológica es enorme. Es conocido que tanto las plantas como los animales carecen de algún/os de estos elementos, causando diversos desórdenes que disminuyen el crecimiento o viabilidad de los seres vivos. Es más, se ha estimado que más de la mitad de la población mundial padece deficiencias de, al menos, un micronutriente como el hierro (Fe), yodo (I), zinc (Zn) o selenio (Se) (OMS, 2006). Según Ríos et al. (2008), el 30% de la población es deficiente en Zn y, aproximadamente el 15% en Se.

2.1.1. El selenio y el zinc en el suelo

De acuerdo con Cakmak et al. (2010), las concentraciones de Se y Zn en plantas de consumo animal y humano está directamente relacionado con las cantidades de estos presentes en el suelo, estando sus disponibilidades a su vez regidas por las principales propiedades del suelo como son el pH, las reacciones redox, capacidad de intercambio catiónico, actividad de microorganismos, estructura, materia orgánica y contenido de agua (Frossard et al., 2000).

Selenio

El contenido de Se en los alimentos está muy relacionado con su contenido en el suelo (Rubio et al., 2007) donde se puede encontrar principalmente bajo cuatro formas: selenito (Se^{4+}) y selenato (Se^{6+}) que pueden ser absorbidos por las plantas, Se elemental (Se^0) y seleniuro (Se^{2-}) que son insolubles (Broadley et al., 2006). Por lo tanto, la biodisponibilidad de Se depende no solo de su contenido total en el suelo, sino también de su forma química. Como se puede apreciar en la Tabla 1.1, en los suelos alcalinos donde el potencial redox es alto, el selenato predomina sobre el selenito, mientras que en los suelos ácidos, el selenito

sustituye al selenato (Cruz-Jiménez, 2005; Hawkesford y Zhao, 2007). La adsorción de selenato y selenito a la fase sólida del suelo disminuye al aumentar el pH del suelo (Barrow y Whelan, 1989). En general, tienden a encontrarse mayores concentraciones en suelos de origen sedimentario frente a aquellos de naturaleza ígnea (Moreno et al., 2005). Es por ello, por lo que, los cultivos situados en suelos volcánicos, así como los regadíos intensivos y, en general, los suelos ácidos, son deficientes en Se (Casals Mercadal et al., 2005).

TABLA 2.1. Formas de Se en suelo

| Nombre | Formula química | Número de oxidación | Donde se encuentra |
|-------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|
| Selenio elemental | Se | 0 | Abundante en suelos ácidos, con bajo potencial redox |
| Seleniuro | Se ²⁻ | -2 | Abundante en suelos ácidos, con bajo potencial redox |
| Selenito | SeO ₃ ²⁻ | 4 | Predominante en suelos ácidos, con potencial redox medio |
| Selenato | SeO ₄ ²⁻ | 6 | Predominante en suelos alcalinos con alto potencial redox |

Fuente: Saha et al. (2017)

Aparte del contenido característico de Se propio de cada suelo, existen otras fuentes de incorporación de Se al suelo, como son la deposición desde la atmósfera, la erosión de rocas y la volatilización de compuestos fósiles, además de aportes del ser humano, provenientes de la combustión de combustibles fósiles, procesado de metales, lodos y aguas residuales y aplicaciones de fertilizantes, estiércol y materia orgánica (Fordyce, 2005). Aún así, el contenido de Se en suelo es normalmente bajo, variando de 0,01 a 2 mg de Se kg⁻¹ con una media de 0,4 mg de Se kg⁻¹, pero para cumplir con los requisitos de nutrición humana, los suelos se han clasificado por Tan (1989) como deficientes (<0,125 mg kg⁻¹), marginales (0,125-0,175 mg kg⁻¹), moderados a altos (0,175-3 mg kg⁻¹) y excesivos (>3 mg kg⁻¹), aunque existen suelos denominados seleníferos con una concentración de Se de más de 5 mg kg⁻¹, estando estos suelos asociados con rocas sedimentarias, areniscas, calizas y suelos con carbón (Oldfield, 1999; Fordyce, 2005).

Zinc

El contenido de Zn en el suelo depende en gran medida, de los cambios ambientales (viento, temperatura, luz, etc.) a los que ha sido expuesta la roca madre del suelo. El contenido medio de Zn en las rocas oscila, de media, entre 70-80 mg kg⁻¹; en los suelos oscila entre 10-300 mg kg⁻¹, con un promedio entre 50 y 66 mg kg⁻¹. El transporte de polvo, incendios y cenizas volcánicas son, también, aportes de Zn al suelo (Broadley et al., 2007). En el mundo, existen millones de hectáreas cultivadas que no disponen de concentraciones de Zn en el suelo consideradas como adecuadas (Alloway, 2008).

Las formas en que podemos encontrar el Zn en el suelo son tres: disuelto en agua, el cual incluye el Zn²⁺ y compuestos orgánicos solubles; adsorbido en compuestos de intercambio coloidales como es el caso de las arcillas y, por último, podemos encontrarlo en complejos insolubles y minerales de Zn. Este último es el que se encuentra en mayor cantidad y representa el 90% del mismo (Barber, 1995; Benavides-Mendoza et al., 2012). Por tanto, el contenido total de Zn no es un índice fiable que refleje la capacidad del suelo para suministrar Zn para la absorción de la planta. El rango crítico de concentración de Zn disponible en el suelo para la mayoría de los cultivos ha sido establecido entre 0,5-2,0 mg Zn kg⁻¹ para DTPA (Sims y Johnson, 1991).

Uno de los principales factores que influyen en la disponibilidad de Zn es el pH del suelo el cual afecta, en gran medida, al movimiento del Zn en el suelo y, por tanto, a la disponibilidad de éste para las plantas. Como se puede observar en la Tabla 1.2, cuando el pH es alto queda ligado a las superficies de intercambio catiónico, por el contrario cuando el pH del suelo es bajo se desplaza más fácilmente de las superficie de intercambio catiónico y es más fácilmente asimilado por las plantas (Baber, 1995).

TABLA 2.2. Concentraciones de Zn ligada a superficie de intercambio catiónico en relación con el pH

| pH del suelo | Concentración de Zn (mg kg ⁻¹) |
|--------------|--------------------------------------------|
| 4,9 | 36,08 |
| 6,4 | 33,44 |
| 6,5 | 28,5 |
| 6,7 | 43,4 |
| 6,9 | 60,36 |
| 6,9 | 41,29 |
| 7 | 56,6 |

Fuente: Diatta y Kociałkowski (1998)

2.2. Importancia del Se y del Zn en plantas, animales y humanos

2.2.1. Plantas: absorción, metabolismo y funciones de ambos

Las plantas necesitan, para su correcto crecimiento y desarrollo fisiológico, tanto macronutrientes como micronutrientes. Los macronutrientes son absorbidos en grandes cantidades (> 0,1%) y se incluyen en este grupo el carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S) y potasio (K). Los micronutrientes son consumidos por las plantas en pequeñas cantidades, entre 5 y 100 mg kg⁻¹, entre los que se encuentra el Zn, Fe, Cu, etc. (Alloway, 2008). En cambio, el Se es absorbido por las plantas superiores desde el suelo de manera fortuita, pues, no hay pruebas de esencialidad de Se en éstas (Pilon-Smits et al., 2009). Algunos autores indican que las plantas absorben el Se en forma de selenato debido a su similitud con el sulfato y luego lo metabolizan a través de la vía de asimilación del S en el cloroplasto (Terry et al., 2000). Por ello, en el proceso de absorción, Se y S compiten por los mismos transportadores y, la captación de Se está generalmente limitada por los altos niveles de azufre (El Kassis et al., 2007).

El selenato está más disponible que el selenito en el suelo para la absorción de la planta porque está adsorbido débilmente a la fase sólida por atracción electrostática (Terry et al., 2000). También se transporta más fácilmente que otras formas de Se dentro del sistema de la planta (Zayed et al., 1998), mientras que el selenito se acumula en las raíces de la planta porque no se transloca fácilmente y se convierte fácilmente en formas orgánicas (Asher et al., 1977).

Los procesos metabólicos y los productos finales del metabolismo de Se dependen de la capacidad de acumulación de la planta (Mehdi et al., 2013). Según la concentración de Se en los tejidos de las plantas podemos clasificarlas en: no acumuladores, acumuladores e hiperacumuladores. Las plantas que no acumulan Se contienen entre 5 y 50 mg kg⁻¹ Se (Mayland, 1989). Los acumuladores se pueden dividir en dos grupos: acumuladores primarios y secundarios. Los acumuladores primarios contienen hasta 1000 mg kg⁻¹ de Se (Mayland, 1989; Mehdi et al., 2013) destacando especies como *Astragalus bisulcatus* y *Stanleya pinnata* que contienen entre 1000-15000 mg kg⁻¹ Se (Sura-de Jong et al., 2015), y los secundarios son aquellas que pertenecen a géneros como *Atriplex*, *Castilleja*, *Grindelia* y *Gutierrezia*, y no contienen más de 50 a 100 mg kg⁻¹ de Se (Mayland, 1989). Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 1.3 las plantas cultivadas poseen una concentración de media de Se entre 0,01 y 1 mg kg⁻¹ (Marschner, 2002).

TABLA 2.3. Concentración de Selenio según especie de planta

| Nombre de la planta | Se en la planta (mg kg ⁻¹) | | | Se en el suelo (mg kg ⁻¹) | Referencia |
|------------------------------|----------------------------------------|-----------|---------------|---------------------------------------|-----------------------|
| | Raíces | Hojas | Semilla/Gramo | | |
| Tabaco | 16.7-58.6 | 2.6-37.3 | NA | 2.2-22.2 | Han et al. (2013) |
| Maiz | 0.31-12.3 | 0.16-36.1 | 0.05-14.5 | 4.11-33.1 | Wang et al. (2012) |
| Arroz | NA | 0.48-1.95 | 1.38-3.33 | 0.13-2.85 | Sharma et al. (2014) |
| Lechuga | NA | 1.59-3.95 | NA | NA | Wakim et al. (2010) |
| Cebolla | NA | 1.29 | NA | NA | Wakim et al. (2010) |
| Garbanzos | NA | NA | 0.79 | NA | Wakim et al. (2010) |
| Trigo | 196 | 387 | NA | 13.1 | Eiche et al. (2015) |
| Mostaza de la India | 186 | 931 | NA | 6.8 | Eiche et al. (2015) |
| Hiperacumuladores | | | | | |
| <i>Astragalus bisulcatus</i> | NA | NA | 5750 | NA | Freeman et al. (2012) |
| <i>Astragalus bisulcatus</i> | 65 | 436 | NA | NA | Alford et al. (2012) |
| <i>Astragalus praelongus</i> | 1281 | 2925 | NA | NA | Alford et al. (2012) |
| <i>Stanleya pinnata</i> . | NA | NA | 1329 | NA | Freeman et al. (2012) |

Fuente: Marschner (2002).

Zinc

El Zn es esencial para todos los organismos vivos, incluyendo las plantas. En éstas, desempeña el papel de cofactor en reacciones enzimáticas; además, está presente en la fotosíntesis y síntesis de azúcares y proteínas, fertilidad y producción de semillas, regulación de crecimiento y defensa contra enfermedades (Malakouti, 2007).

El Zn es absorbido por las plantas en su forma iónica (Zn^{2+}) y en forma de ligandos orgánicos. La actividad de absorción se produce en los pelos radicales, donde el Zn es transportado, generalmente vía simplástica. Como consecuencia de una deficiencia de Zn, la membrana plasmática de la célula radicular libera aminoácidos no proteicos llamados "Fitosideróforos" o "Fitometalóforos", los cuales generan unos potenciales electroquímicos para unirse al Fe o al Zn y transportarlo a la cara exterior de la membrana plasmática de la célula radicular (Kochian, 1993; Benavides-Mendoza et al., 2012).

El contenido de Zn aceptable en tejidos vegetales está 15 y 50 mg kg⁻¹ de materia seca (Marschner, 2002). Sin embargo, en la mayoría de los casos, esta por debajo como se puede observar en la Tabla 1.4.

TABLA 2.4. Concentración de Zn en distintas especies de plantas

| N. Científico | Especie | N. común | Familia | [Zn] ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|-------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| <i>Ageratum conyzoides L.</i> | | | Asteraceae | 9.34±0.26 |
| <i>Bambusa bambos L.</i> | | Bambú de la India | Poaceae | 3.92±0.34 |
| <i>Bougainvillea spectabilis L.</i> | | Bugamvilia | Nyctaginaceae | 8.65±0.13 |
| <i>Cynodon dactylon L.</i> | | Gramma, cesped | Poaceae | 5.89±0.35 |
| <i>Ficus religiosa L.</i> | | | Moraceae | 2.76±0.13 |
| <i>Mangifera indica L.</i> | | Mango | Anacardiaceae | 8.35±0.27 |
| <i>Peltophorum pterocarpum L.</i> | | | Fabaceae | 1.60±0.12 |
| <i>Portulaca oleraceae L.</i> | | | Portulacaceae | 2.56±0.16 |
| <i>Ricinus communis L.</i> | | higuerilla | Euphorbiaceae | 6.42±0.19 |
| <i>Terminalia catappa L.</i> | | Almendrón | Combretaceae | 5.89±0.24 |

Fuente: Deepalakshmi et al., (2014)

2.2.2. Animales (necesidades y problemas de su deficiencia)

Selenio

El Se está contenido en los tejidos animales, concretamente, es un componente esencial de más de 30 selenoproteínas en mamíferos (Brown y Arthur, 2001). Es por ello por lo que está considerado nutriente esencial para éstos (Rotruck et al., 1972). La deficiencia de Se en animales provoca una alteración del sistema inmunitario de éstos (Grasso et al., 1990), afecta los parámetros reproductivos y rendimiento animal (Rivadeneira et al., 2015). Se ha asociado con mastitis en vacas lecheras influyendo positivamente la suplementación con Se

en la aparición de esta patología (Ramos et al., 2008), así como, es responsable de la aparición de la enfermedad del musculo blanco (Malagoli et al., 2015).

Mientras que se estima entre 0,1 – 0,3 mg de Se kg⁻¹ de materia seca la cantidad de Se necesaria en plantas de consumo animal, la concentración tóxica estaría entre 3 y 5 mg kg⁻¹ (Mayland, 1994).

Zinc

El Zn es un mineral esencial, el cual está presente en más de 300 enzimas que realizan funciones vitales, como son: la Cobre-Zinc superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD), la fosfatasa alcalina, la anhidrasa carbónica, enzimas presentes en la secreción pancreática (carboxipeptidasas A y B), las colagenasas y la piruvatocinasa. También es un oligoelemento requerido para la división y diferenciación celular (Tapiero y Tew, 2003).

Los efectos de la deficiencia de Zn son entre otros, una menor eficacia alimenticia generando por tanto, una menor ganancia de peso (Engle et al., 1997), menor resistencia a infecciones (Klaus-Helge y Rink, 2003), retenciones placentarias y mastitis en animales reproductores (Boland, 2003) y mayor incidencia de lesiones podales (Socha et al., 2002).

En cuanto a los valores medios necesarios en la dieta de los animales, varían según la edad sexo y estado reproductivo, considerándose que niveles inferiores a 20 mg de Zn kg⁻¹ en la dieta de los animales sería una dieta deficiente en Zn (Mufarrege, 1999), siendo la cantidad ideal de 30 mg de Zn kg⁻¹ (NRC, 2000).

2.2.3. Ser humano: necesidades, problemas de su deficiencia y cuantificación de carencias en el mundo.

Selenio

El Se es un elemento fundamental para la salud humana debido a que se encuentra en las selenoproteínas, que desempeñan un papel importante en muchas funciones biológicas: actúan como defensa antioxidante, como catalizador para la producción de la hormona tiroidea (Casals Mercadal et al., 2005), son necesarias para la motilidad de los espermatozoides humanos y reducen el riesgo de aborto espontaneo (Rayman, 2012). Tiene un papel fundamental, además de la vitamina E, en la función muscular al mejorar la

resistencia y la recuperación y en retardar el proceso de envejecimiento (Cabaraux et al., 2007; Suttle, 2010). Puede intervenir en el metabolismo de varios metabolitos, como el metilselenol, que desempeña un papel en la prevención del cáncer, relacionándose una deficiencia en la ingesta de Se con el aumento de la probabilidad de padecer distintos tipos de cáncer (Aréchiga et al., 1998; Rayman, 2012). Combs (2001) comprobó que las personas que ingieren alimentos enriquecidos en Se adquieren una protección adicional.

La recomendación estimada de consumo de Se para mujeres y hombres es de 60 y 75 μg de Se al día, respectivamente (Broadley et al., 2006). Esta recomendación se incrementa a 65 μg para mujeres embarazadas y 75 μg durante la lactancia. Las directrices de 2006 de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establecen la ingesta superior tolerable en 300 μg día⁻¹ para adultos, siendo para los niños de 1 a 3 años de 60 μg día⁻¹ y de 250 μg día⁻¹ para niños hasta de 17 años.

Zinc

El Zn está presente en una gran cantidad de funciones fisiológicas y de regulación. Se conoce que, en humanos, se une a 925 proteínas diferentes y existen más de 300 enzimas que contienen Zn involucradas en los procesos metabólicos clave (Hambidge, 2000). Como consecuencia de esta amplia participación en el metabolismo humano, la deficiencia de este elemento tiene diversos efectos sobre la salud humana influyendo en el crecimiento físico, funcionamiento del sistema inmunitario, salud reproductiva y desarrollo neuroconductual entre otros (Rubio et al., 2007; Alloway, 2008).

El Grupo Consultivo Internacional de Nutrición con Zinc (IZiNCG) ha estimado que la deficiencia de Zn afecta a un tercio de la población mundial, con una incidencia que varía entre el 4 y el 73% en diferentes países (Hotz y Brown, 2004).

La ingesta recomendada de Zn para un adulto, como se observa en la Tabla 1.5, se sitúa entre 9 mg día⁻¹ para las mujeres y 19 mg día⁻¹ para los hombres (Hotz y Brown, 2004). Respecto a su toxicidad, el Zn es el elemento menos tóxico de todos los oligoelementos y tiene un amplio margen de seguridad, no obstante, algunos autores han evaluado la ingesta máxima admisible y la han estimado en 40 mg día⁻¹ (Rubio et al., 2007).

TABLA 2.5. Asignaciones dietéticas recomendadas revisadas (RDA) para el zinc por etapa de vida y tipo de dieta según lo sugerido por IZiNG

| Edad | Sexo | Peso de persona (kg) | Dieta vegetariana (mg día ⁻¹) | Dieta básica (mg día ⁻¹) |
|--------------|------|----------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| 6 - 11 meses | ♂+♀ | 9 | 4 | 5 |
| 1 - 3 años | ♂+♀ | 12 | 3 | 3 |
| 4 - 8 años | ♂+♀ | 21 | 4 | 5 |
| 9 - 13 años | ♂+♀ | 38 | 6 | 9 |
| 14 - 18 años | ♂ | 64 | 10 | 14 |
| 14 - 18 años | ♀ | 56 | 9 | 11 |
| Embarazo | ♀ | - | 11 | 15 |
| Lactación | ♀ | - | 10 | 11 |
| > 19 años | ♂ | 65 | 13 | 19 |
| > 19 años | ♀ | 55 | 8 | 9 |
| Embarazo | ♀ | - | 10 | 13 |
| Lactación | ♀ | - | 9 | 10 |

Fuente: Hotz y Brown (2004)

2.3. Estrategias de remediación

Entre las diferentes estrategias que se pueden seguir para aumentar la ingesta de estos minerales están la diversificación dietética, suplementación mineral, fortificación de alimentos (adición de micronutrientes al agua o alimentos) y enriquecimiento de elementos minerales en el producto (biofortificación) (Rayman, 2002, 2004; Alloway, 2008).

2.3.1. Diversificación dietética

Existen alimentos como las nueces o el cangrejo que, de forma natural, contienen altos niveles de Se, pero no se consumen en grandes cantidades, por lo que el potencial de diversificación dietética para el aumento de Se es relativamente limitado (Rayman, 2002). También, el Zn está presente en muchos alimentos, como el marisco, las carnes rojas, productos lácteos y granos de cereales y legumbres en altas concentraciones (20-50 mg Zn kg⁻¹ peso fresco), pero, muchas personas en países en desarrollo no tienen un acceso a un suministro suficiente de estos alimentos, en otros casos son las costumbres religiosas o sociales el factor limitante (Hotz et al., 2004).

2.3.2. Fortificación de alimentos

El uso de suplementos con alto contenido en Se y Zn parecen eficaces y podrían ser una buena opción, sin embargo, los suplementos son relativamente caros y solo una pequeña parte de la población y de los ganaderos tomarían tales medidas. También, las estrategias de fortificación, es decir, la adición de estos micronutrientes durante algún momento del procesado de los alimentos, parecen útiles, aunque no siempre han sido idóneas pues requieren modificaciones en la legislación de cada país en cuanto a los micronutrientes que se pueden añadir durante el procesado alimentario (Broadley et al., 2006; Bouis et al., 2011).

2.3.3. Biofortificación de los cultivos

Por último, la biofortificación, es decir, la aplicación de elementos esenciales a la parte comestible de las plantas mediante prácticas agrícolas con el fin de disminuir el déficit de micronutrientes en animales y seres humanos (White y Broadley, 2005), parece ser la estrategia más útil para aumentar la concentración de micronutrientes en los alimentos de consumo humano o animal (Graham et al., 2001; Bouis et al., 2003; Lyons et al., 2003; White y Broadley, 2008). Es más, la aplicación de fertilizantes minerales (biofortificación agronómica) junto a con una mayor capacidad de adquirir elementos minerales de algunas especies y/o variedades (biofortificación genética) se ha comprobado que es una estrategia inmediata no solo para aumentar las concentraciones de minerales en cultivos comestibles, sino también a mejorar los rendimientos en suelos deficientes en algún nutriente, como en el caso del Zn (Graham et al., 2007; Pfeiffer y McClafferty, 2007).

Ahora bien, con el fin de que los programas de biofortificación sean eficaces para aumentar la ingesta diaria de animales y personas, se deben realizar en cultivos que formen parte de sus dietas básicas. En este sentido, las leguminosas junto con los cereales son idóneas para estos estudios (Thavarajah et al., 2010).

Biofortificación agronómica con selenio

La biofortificación con Se se ha llevado a cabo en Finlandia desde la década de los 80 y ha mejorado considerablemente el nivel de Se en sangre en la población general (Alfthan et

al., 2014). También en las zonas de China con déficit de Se, la biofortificación con Se se está llevando a cabo con el fin de prevenir la enfermedad de Keshan (Bañuelos et al., 2013).

Normalmente, los productos vegetales destinados a alimentación animal son pobres en Se, a excepción de aquellas con alto contenido proteico (Diaz Alarcón et al., 1994) los cuales tienen una tendencia natural a acumular mayores niveles de Se, como los pertenecientes a los géneros Brassica y Allium (Terry et al., 2000).

El suministro de Se en forma de selenato vía foliar, en pequeñas concentraciones, tiene un efecto beneficioso sobre los cultivos aumentando la materia seca final y mejorando los niveles de antioxidantes flavonoides naringenina, calcona y kaempferol (Schiavon et al., 2013; Costa de Oliveira et al., 2018)

Existen ensayos de biofortificación con Se en varias especies: zanahoria (Costa de Oliveira et al., 2018), tomate (Schiavon et al., 2013), raygrás (Cartes et al., 2005), arroz (Fernandes et al., 2013), lechuga (Ramos et al., 2011) y, todos ellos coinciden en la mayor eficacia del selenato sobre el selenito.

Si bien, es verdad, que algunos autores han observado menor absorción de otros nutrientes con aplicación de Se al suelo. En un ensayo con zanahoria (*Daucus carota*) disminuyó la concentración de K un 26% en la parte aérea de las plantas (Costa de Oliveira et al., 2018); también, Drahonovsky et al., (2016) apreció esta disminución de K en plantas silvestres. Para el trigo cultivado en solución nutritiva, Guerrero et al., (2014) observó que, cuando las plantas fueron sometidas a diferentes concentraciones de Se, tanto de selenato como de selenito, hubo una reducción de la concentración de Fe, tanto en la parte aérea como en las raíces; en colza, Zembala et al., (2010) detectó una reducción del contenido de Fe en las raíces cuando se aplicó Se en suelo como selenato.

Biofortificación agronómica con Zinc

El Zn ha recibido creciente atención y se le considera, junto con la deficiencia de vitamina A, como uno de los problemas más serios de la salud pública alimentaria a nivel mundial. Por ello, es común la biofortificación de cultivos con sulfato u óxido de Zn (Cakmak et al., 2010; Benavides-Mendoza et al., 2012; Ghasemi et al., 2013 y Gomez-Coronado et al., 2016), tanto foliar como aplicado al suelo, aunque la aplicación en suelo ha resultado ser menos efectiva a la hora de acumular Zn en las partes comestibles aunque sí mejora el

rendimiento de los cultivos, más que la aplicación foliar (Cakmak et al., 2010), aconsejándose la aplicación combinada suelo+foliar para mejorar tanto los rendimientos como la concentración de Zn en las partes comestibles de los cultivos (Poblaciones y Rengel, 2016).

Por otro lado, se ha visto que no solo es importante evaluar la concentración de Zn en planta, sino también aumentar su biodisponibilidad, ya que la presencia de componentes antinutritivos, como el ácido fítico principalmente, limita la cantidad eficientemente absorbida de determinados minerales (Adams et al., 2002), debido a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales y proteínas (Sugiera et al., 1999) convirtiéndolos en no asimilables para el hombre y animales monogástricos (Pettersson et al., 1999). Existen varios métodos para determinar la biodisponibilidad del Zn, uno de ellos, es el ratio molar fitato (valores mayores de 15 indican una deficiencia de Zn) (Vargas y Lobo, 1992). El ácido fítico se encuentra en los alimentos en niveles del 0,1 – 6% (Ferguson et al., 1988), dependiendo su concentración de la parte de la planta que vaya a ser consumida: en semillas los niveles son elevados, en raíces y frutas moderados, y en follaje bajos (Ravindran et al., 1994).

2.4. El guisante forrajero: origen e importancia

El guisante (*Pisum sativum* L.) es un cultivo oriundo del Cercano Oriente (Zohary y Hopf, 2000) y de Asia Central (Riehl et al., 2013). Hace unos 10 000 años a.C. se empezaron a domesticar los primeros cultivos, entre ellos el guisante junto con otras leguminosas de grano y cereales, componentes principales de la dieta de las primeras civilizaciones en el Oriente Medio y el Mediterráneo. Desde el Cercano Oriente, el guisante se propagó hacia el norte hasta la actual Rusia, y hacia el oeste, a través del valle del Danubio, a las antigua Grecia y Roma, lo cual facilitó su expansión por Europa del Norte y Occidental. Asimismo, hacia el Este se expandió hasta Persia, India y China (Chimwamurombe y Khulbe, 2011). En Europa, el guisante se ha cultivado desde la Edad de Piedra y la Edad del Bronce (De Candolle, 2007).

En la actualidad, es un cultivo muy utilizado a nivel mundial con 7,6 millones de ha y algo más del doble en producción (Tabla 1.6) (FAOSTAT, 2016), cuyo destino es fundamentalmente para alimentación animal, tanto para forraje como en la formulación de piensos, debido principalmente al elevado contenido proteico de su grano (Warkentin et al., 2015).

A nivel europeo, se cultivan unos 2,2 millones de ha con una producción algo superior a 5,3 millones de toneladas (FAOSTAT, 2016) (Tabla 1.6). Es la leguminosa más cultivada en el Centro Europa, aunque su consumo es bajo en comparación con otras fuentes de proteínas (Chrenkova et al., 2007).

Actualmente en España, los guisantes secos son las leguminosas más cultivadas, con unas 173 mil ha (MAPAMA, 2017). Se utilizan principalmente para alimentación animal (alrededor del 85% de la producción total) como guisantes secos, siendo el resto cosechados para consumo humano como guisantes frescos. La superficie cultivada de guisante se ha cuadruplicado durante la última década y está en aumento siendo los principales productores a nivel nacional Castilla La Mancha, Andalucía y Castilla y León. En Extremadura, la superficie cultivada es de 9 713 ha, de las cuales casi el 100% se encuentran en Badajoz (FAOSTAT, 2016; MAPAMA, 2017).

TABLA 2.6. Superficie, producción y rendimiento del guisante seco en el año 2016

| Dominio | Superficie (ha) | Producción (t) | Rendimiento (kg ha⁻¹) |
|----------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------------------|
| Mundo | 7.625.705 | 14.363.099 | 1.883 |
| Europa | 2.273.879 | 5.344.672 | 2.350 |
| España | 174.034 | 201.219 | 1.156 |
| Extremadura | 9.713 | 10.927 | 1.125 |
| Badajoz | 9.500 | 10.735 | 1.130 |

Fuente: Elaboración propia (FAOSTAT, 2016; MAPAMA, 2017).

En la alimentación animal, ha aumentado la demanda de proteína para la elaboración de piensos para engorde, siendo la más cercana y más asequible la de origen vegetal. Por ello, actualmente se incorpora un porcentaje entre el 15 y el 20% de proteína vegetal en la producción de piensos. Entre las fuentes de dicha proteína se encuentra la soja, el maíz, la cebada, y también el guisante. En alimentación humana, el guisante seco tiene importancia en Asia como base para la preparación de un alimento popular, el dal. Asimismo, el guisante seco puede procesarse extrusionado en la preparación de aperitivos y de los fideos finos conocidos como “noodles” (Warkentin et al., 2015).

2.4.1. Características, ecología y necesidades edafo-climáticas

El guisante es una planta anual de la familia de las leguminosas, perteneciente al género *Pisum*. Dentro de éste, se reconocen dos especies: *Pisum sativum* L. que es el guisante cultivado y *Pisum fulvum* Sibeth y Smith (Adsule et al., 1989).

Entre sus características botánicas destacan sus tallos angulosos, de sección y porte variables con una altura aproximada de 90 cm. Tiene hojas compuestas con folíolos, pudiendo aparecer variedades normales, áfilas y semiáfilas, dependiendo de la presencia o ausencia de folíolos y estípulas. En líneas generales, la mayoría de las variedades cultivadas de guisantes secos suelen ser semiáfilas, es decir, con ausencia de folíolos y presencia de dos estípulas en su base bien desarrolladas. Su sistema radicular posee una raíz pivotante que puede alcanzar hasta un metro de profundidad (Pavek y Mc Gee, 2016).

Las flores son de fecundación autógena, aunque existe un cierto porcentaje, generalmente muy pequeño, de fecundación cruzada, siendo en este caso los insectos los agentes polinizadores. Dependiendo de la precocidad del cultivar, el tallo principal puede desarrollar desde seis a más de veinte nudos. Los primeros nudos son vegetativos, pudiendo ramificar en éstos, siendo los siguientes reproductivos. Generalmente se desarrollan dos flores en cada nudo reproductivo donde se producen los frutos de tipo legumbre. El número de granos por vaina depende de la variedad y el ambiente, oscilando entre 4-9 granos (Elzebroek y Wind, 2008).

El guisante se caracteriza por ser un cultivo de regiones templadas y húmedas, que soporta bastante bien las bajas temperaturas. Sin embargo, temperaturas por encima de 27 °C suelen afectar a la planta, acortando el ciclo del cultivo, y reduciendo el rendimiento final de grano, en condiciones de sequía. En nuestras condiciones agroclimáticas el periodo de cultivo varía entre 90 y 110 días.

Las temperaturas óptimas de desarrollo y reproducción están comprendidas entre los 16-21°C para el día y 10-16°C para la noche. Su cero vegetativo se encuentra entre 4-5°C (Cubero, 2017).

Los suelos más adecuados para el cultivo del guisante son de textura franca a arcillosa, con pH comprendido entre 5,5-8, aunque en suelos con altos niveles de carbonatos y calizas activas, se presentan problemas de clorosis por bloqueo del hierro y carencia de magnesio.

Los suelos que presentan problemas de compactación reducen considerablemente el rendimiento final del cultivo por disminución del área fotosintética activa (Perea et al., 2015).

Las principales plagas y enfermedades del guisante son: el pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum*), la sitona (*Sitona lineatus*), el gorgojo (*Bruchus pisorum*), antracnosis (*Ascochyta pisi* Lib.), el moteado (*Mycosphaerella pinioides*), la roya (*Uromyces pisi*) y el oidio (*Erysiphe pisi*) (Lafarga et al., 2003).

2.4.2. Composición nutricional

Las leguminosas de grano en general y, el guisante en particular, son una fuente importante de energía y proteína en la alimentación animal. Éste y la harina de soja constituyen más del 90% del total de las fuentes proteicas utilizadas en la Unión Europea (Cesfac, 2008).

Algunos investigadores indican que *Pisum sativum* es una excelente fuente de nutrientes para todas las especies de animales con alta digestibilidad y palatabilidad (Chrenkova et al., 2007). Según la Fundación Española de la Nutrición, el grano de guisante es de alto contenido proteico (de 18 a 28%, en función de variedad y origen) y energético (35 a 48% de almidón) y bajo contenido en fibra bruta (de 4 a 8% en función, primordialmente, del tamaño de la semilla) (Tabla 1.7). Además, aporta un contenido significativo de minerales tales como el fósforo, hierro, potasio y magnesio. En cuanto a las vitaminas, hay que destacar su contenido en tiamina, niocina, fosfatos y vitamina C (FEN, 2011; González et al., 2014).

TABLA 2.7. Composición nutricional (%) de la semilla del guisante.

| Elementos | GRDC (1997) | NRC (1998) | CIGI (2003) | INRA (2006) | Pr. N. (2008) | FEDNA (2009) |
|-------------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|
| Materia seca | 90,3 | 89 | 90 | 86,4 | 86 | 88,1 |
| Proteína bruta | 23,2 | 22,8 | 23 | 20,7 | 20,5 | 20,6 |
| Almidón | 42 | - | 46 | 44,6 | 44 | 42,5 |
| Azúcares totales | - | 3,9 | 4,6 | 4,6 | 4 | 3,5 |
| Cenizas | 2,5 | 3 | 3,3 | 3 | 3 | 2,8 |
| Fibra bruta | 5,9 | 5,5 | 5,5 | 5,2 | 6 | 6 |
| FND | 13,3 | 12,7 | 16,7 | 12 | 12 | 12,1 |
| LAD | 0,5 | - | 0,5 | 0,3 | - | 0,7 |
| Calcio | 0,07 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,09 | 0,08 |
| Fósforo | 0,4 | 0,39 | 0,39 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Magnesio | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,14 | 0,13 | 0,12 |
| Potasio | 0,82 | 1,02 | 1,02 | 0,98 | 0,95 | 1,05 |
| Sodio | 0,01 | 0,04 | 0,04 | 0,01 | 0,02 | 0,02 |
| Cloro | - | 0,05 | 0,05 | 0,08 | 0,1 | 0,07 |
| Azufre | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,18 |
| Cobre, mg | 6 | 9 | 9 | 7 | 7 | 9 |
| Hierro, mg | 53 | 65 | 65 | 92 | 80 | 95 |
| Manganeso, mg | 16 | 23 | 23 | 9 | 10 | 13 |
| Zinc, mg | 30 | 23 | 23 | 32 | 31 | 45 |

GDRC: Grains and Development Corporation (Australia). NRC: Nutrition Resource Centre (Canadá). CIGI: Canadian International Grains Institute (Canadá). INRA: Institute National de la Recherche Agronomique (Francia). Pr. N: Premier Nutrition (Reino Unido).

Fuente: González et al. (2014)

El guisante tiene un importante potencial en nuevas aplicaciones alimentarias, no sólo por su elevado contenido protéico, sino porque además contiene almidón de digestión lenta y altos niveles de fibra soluble e insoluble, además de una baja alergenicidad (Warkentin et al., 2015).

2.4.3. Experiencias previas de biofortificación en guisante

Debido a la alta utilización del guisante en alimentación humana y animal, es considerado una especie apta para su utilización en programas de biofortificación, de hecho, se han realizado estudios con Fe, Zn, Ca, Mg y P, entre otros (Amarakoon et al., 2012). Existen algunos estudios, no muchos, en los que se ha experimentado sobre el

enriquecimiento del guisante mediante biofortificación agronómica con Se y Zn o ambos al mismo tiempo.

En 2013, Poblaciones et al. realizaron un estudio de biofortificación con Se en Extremadura (España) en esta especie para aprovechamiento de grano. La biofortificación se realizó con un fertilizante de Se vía foliar, en forma de selenito y selenato. La cantidad de Se almacenada en grano y la dosis aplicada de fertilizante mostraron una relación lineal, también vieron que el selenato se almacenaba en mayores cantidades que el selenito. También se ha visto en un estudio realizado en Australia que la aplicación de selenato foliar influye positivamente en la raíz aumentando el peso seco y la nodulación, así como, en el grano aumentando su peso seco; sin embargo no influye en los brotes ni en el contenido proteico del guisante (Poblaciones y Rengel, 2018).

Normalmente, en programas de biofortificación con Zn, a diferencia del Se, con el que la biofortificación es únicamente vía foliar, se realiza, normalmente aplicación foliar y al suelo. Son muy positivos los resultados obtenidos hasta el momento con este nutriente. Se ha visto que tanto la aplicación foliar como la aplicación al suelo aumentan el peso seco de los brotes, así como parámetros de la raíz (longitud, diámetro y superficie radicular); además, el contenido proteico se vio influenciado positivamente con el tratamiento foliar (Poblaciones y Rengel, 2016).

La aplicación combinada de Se y Zn ha resultado también ser positiva. Poblaciones y Rengel (2017 y 2018), vieron que la aplicación de selenato implica una mayor concentración de Zn en el grano de guisante, a la vez que las plantas presentaron una menor concentración de fitatos de Zn.

Al ser las experiencias previas llevadas a cabo bajo condiciones de invernadero, estudiar el comportamiento del guisante forrajero, leguminosa de gran importancia en España y en Extremadura en condiciones reales de campo, ayudará a mejorar el conocimiento sobre el efecto de la biofortificación agronómica combinando el Se y el Zn sobre la acumulación de ambos en el forraje producido, así como el efecto sobre la producción y calidad del forraje producido.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la absorción de Se y Zn del guisante forrajero utilizado en la alimentación animal en los sistemas de producción de ganadería extensiva, mediante programas de biofortificación agronómica de estos nutrientes bajo condiciones semiáridas mediterráneas, con la finalidad de aumentar la rentabilidad de la dehesa, respetando y conservando el medio ambiente, e intentando que los aportes energéticos exteriores al sistema de la dehesa sean mínimos, dando un valor añadido a sus producciones al mejorar el estado de salud del ganado debido al aumento del nivel de Se y Zinc en la dieta del ganado. A su vez, al aumentar el nivel de Se y Zn en la dieta del ganado aumentará en los productos para consumo humano.

Para esta finalidad deberán llevarse a cabo los siguientes puntos:

- Evaluar la influencia de la aplicación de Se y Zn, tanto por separado como en combinación, sobre la absorción, acumulación y biodisponibilidad de estos minerales en el guisante forrajero.
- Estudiar el efecto de la aplicación de Se y Zn en el rendimiento de la biomasa, así como los parámetros fundamentales del valor agronómico.
- Analizar los parámetros de calidad del guisante forrajero.
- Determinar la dosis de aplicación foliar de selenato sódico y sulfato de zinc.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Localización del proyecto

El ensayo se realizó en los terrenos de la Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura (Figura 3.1), situada en la Avenida Adolfo Suárez, s/n de Badajoz (España) (latitud N 38° 53'; longitud W 6° 57'; altitud 186 m) en la campaña 2017/2018.



FIGURA 4.1. Vista aérea de la finca. Fuente: Google Maps

4.2. Determinación edafoclimática del ensayo

Para la clasificación climática de la zona en cuestión se han tomado datos pertenecientes al Sistema de Información Agroclimática para el Regadío (SIAR) de la estación de “Bercial”, muy próxima al lugar donde se instaló el ensayo objeto de este estudio.

Según la clasificación climática de Papadakis, la zona en la que se emplazó el ensayo posee un clima Mediterráneo Subtropical presentando un invierno tipo *Avena* y verano tipo *Algodón*. Los valores medios de las variables climáticas más importantes son las siguientes:

- Temperatura media anual: 16,25 °C
- Temperatura media del mes más frío (Enero): 7,93 °C

- Temperatura media del mes más cálido (Julio): 24,86 °C
- Evapotranspiración media anual: 1200 mm
- Duración media del periodo seco: 4-5 meses
- Periodo frío o de heladas: 4 meses
- Precipitación media anual: 461,55 mm
- Precipitación de primavera: 108,48 mm (23,5%)
- Precipitación de verano: 33,57 mm (7,27%)
- Precipitación de otoño: 177,75 mm (38.51%)
- Precipitación de invierno: 141,75 mm (30.71%)

A continuación, se exponen más detalladamente los datos climatológicos medios mensuales desde 1998 hasta 2018 (Tabla 3.1.).

TABLA 4.1. Datos climáticos de la estación “Bercial”

| MES | Tm (°C) | Tmáx (°C) | Tmín (°C) | HR media | Rad (MJ m ⁻²) | P (mm) | Eto |
|------------|---------|-----------|-----------|----------|---------------------------|--------|---------|
| Enero | 7,93 | 18,35 | -2,17 | 86,75 | 8,06 | 44,46 | 31,2 |
| Febrero | 9,25 | 20,46 | -1,46 | 79,65 | 11,81 | 45,57 | 48,15 |
| Marzo | 12,16 | 24,93 | 0,27 | 74,55 | 15,98 | 51,59 | 83,24 |
| Abril | 14,73 | 28,46 | 3,81 | 71,77 | 20,44 | 53,69 | 110,95 |
| Mayo | 18,36 | 33,61 | 5,93 | 65,25 | 24,51 | 41,5 | 151,94 |
| Junio | 22,9 | 38,09 | 10,14 | 57,26 | 27,55 | 14,38 | 184,41 |
| Julio | 24,86 | 39,65 | 11,83 | 52,67 | 27,92 | 4,33 | 213,26 |
| Agosto | 25,13 | 39,81 | 11,38 | 51,54 | 24,2 | 7,17 | 1911,67 |
| Septiembre | 21,78 | 36,19 | 9,36 | 60,11 | 18,61 | 22,67 | 128,37 |
| Octubre | 17,03 | 30,34 | 4,71 | 73,89 | 12,94 | 68,27 | 75,00 |
| Noviembre | 11,31 | 23,44 | 0,02 | 82,08 | 9,13 | 54,39 | 40,13 |
| Diciembre | 8,22 | 18,54 | -2,51 | 86,73 | 7,07 | 54,88 | 27,29 |

Tm (temperatura media), Tmáx (media de la temperatura máxima mensual), Tmín (media de las temperaturas mínimas mensuales), HR media (media mensual de la humedad relativa media), Rad (radiación solar), P (precipitación), ETo (Evapotranspiración de referencia calculada según el método de Penman-Monteith). Fuente: SIAR.

El suelo donde se implantó el ensayo es de tipo *Xerofluvent oxiácuico* (Soil Taxonomy, 1999). Para la caracterización edáfica del terreno se recogieron, antes de la implantación del ensayo, cuatro muestras de suelo a 30 cm de profundidad. Estas se secaron hasta pesada constante y tamizaron a 2 mm. De cada muestra se determinó:

- Textura: determinada obteniendo gravimétricamente las proporciones de arcilla, limo y arena y, posteriormente, mediante el triángulo de texturas U.S.D.A.

- pH: mediante un pH-metro CRISON utilizando una relación de 10 g de suelo: 25ml de agua destilada (1:2,5).
- Conductividad eléctrica: realizando la medida en un extracto de suelo 1:2 utilizando un conductivímetro CRISON Basic 30.
- Materia orgánica: determinada por el método Walkley y Black mediante oxidación con dicromato y determinación calorimétrica.
- Nitrógeno total: fue determinado por el método Kjeldhal (oficial RD 2257/1994).
- Fósforo disponible: se llevó a cabo por el método Olsen.(Olsen et al., 1954).
- Potasio (K) y sodio (Na) de cambio: para su determinación se extrajeron con acetato amónico 1N tamponado a pH 7. Se determinaron con electrodo selectivo.
- Calcio (Ca) y magnesio (Mg) intercambiable. El contenido de estos nutrientes en todos los suelos fue determinado de la siguiente forma: una porción de cada suelo fue finamente molido (<0,45 mm) usando un molino de bolas de ágata (Retch PM 400 mill), siendo los nutrientes extraídos usando el método del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (IITA 1981; Norvell, 1989). La concentración de los nutrientes fue medido por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, Vista-Pro Axial, Varian Pty Ltd, Mulgrave, Australia). Dicha analítica se llevó a cabo por el Servicio de Análisis Elemental y Molecular (SAEM) de la Universidad de Extremadura.
- Selenio disponible. En cada muestra de suelo el Se se determinó de la siguiente manera: se utilizó una parte de cada muestra de suelo seco, que mediante un molino de bolas de ágata (Retch PM 400 mill) se trituró en partículas con un tamaño inferior a 0,45 mm. Por otra parte, de esta porción de suelo molido se realizó la extracción mediante una disolución de KH_2PO_4 (0,016 mM, pH 4,8) en una proporción de: 10 g peso seco suelo/30 ml KH_2PO_4 p/v, según el método descrito por Zhao y McGrath (1994) y se determinó con el ICM-MS descrito anteriormente.
- Zinc disponible. La extracción del Zn disponible se obtuvo a partir de la disolución del suelo en solución DTPA. El procedimiento de extracción consiste en colocar 10 g del suelo tamizado y secado al aire junto con 20 ml de la solución extractora. Una vez está la muestra de suelo junto a la solución, se agita con un agitador horizontal durante 2 horas a 120 rpm. Después, mediante un filtro de 0,22 micras y una jeringuilla se extrae la solución. La determinación de la concentración de Zn se llevó a cabo mediante ICP-MS (Plasma de Acoplamiento Inductivo con Detector de Masas) en el SAEM.

4.3. Material utilizado y técnicas culturales

La variedad de guisante (*Pisum sativum*, L.) utilizada en el experimento de campo fue Guifredo. Según GENVCE (2010) es una variedad de otoño que presenta una producción media de 3 425 kg ha⁻¹ y un índice productivo de 101,1%, respecto a las variedades tomadas como testigo para el guisante.

Previo a la siembra, se realizó una preparación del terreno mediante dos pases cruzados de grada y un pase de rotovator, con el fin de desmenuzar los terrones y dejar el terreno listo para la siembra. También se realizó, antes de la siembra, un abonado de fondo N-P-K (15/15/15) a una dosis de 100 kg ha⁻¹ en todas las parcelas del ensayo así como, un abonado de fondo con sulfato de zinc (ZnSO₄) a una dosis de 50 kg ha⁻¹ en la mitad del ensayo que será descrito en el siguiente punto.

Con el objetivo de combatir las malas hierbas, se aplicó un herbicida con materia activa Linuron 50% p/p.

Finalmente, la recolección se realizó a finales de abril, donde se recogieron de cada parcela una muestra con un marco de 0,5 x 0,5m (0,25 m²) la cual sirvió para calcular el rendimiento de biomasa por ha (kg ha⁻¹).

4.4. Diseño experimental

El ensayo se realizó en parcelas subdivididas (Split-plot) (Figura 3.2.) con cuatro repeticiones siendo la parcela principal la aplicación de Zn y la subparcela la aplicación de Se.

- Parcela principal: biofortificación con Zn utilizando sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O) con cuatro tratamientos:

1. No aplicación de Zn (NoZn)
2. Aplicación inicial de fondo al suelo de 46 kg de Zn ha⁻¹ (Zn 50S)
3. Aplicación foliar de 8 kg de ZnSO₄·7H₂O ha⁻¹ aplicada en dos momentos, una de 4 kg de ZnSO₄·7H₂O ha⁻¹ aplicada al inicio de la floración y otra de 4 kg de ZnSO₄·7H₂O ha⁻¹ aplicada dos semanas después (Zn 8F)

4. Aplicación combinada suelo+foliar por tanto con la aplicación inicial de fondo al suelo de 50 kg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ha^{-1} + aplicación foliar de 8 kg de Zn ha^{-1} (Zn 50S+8F) aplicada de igual forma que en el tratamiento Zn 8F.

- Sub-subparcela: biofortificación con Se utilizando selenato disódico Na_2SeO_4 con dos tratamientos:

1. No aplicación de Se (No Se)
2. Aplicación foliar de 10 g de Se ha^{-1} (Se10)

El tratamiento de Zn al suelo se realizó previo a la siembra, el 31 de octubre del 2017. Consistió en la distribución en superficie de 50 kg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ha^{-1} junto con la correspondiente fertilización de fondo de cada cultivo y su posterior incorporación al suelo antes de la siembra.

El abonado foliar se realizó cuando el cultivo estaba en fase de floración (EC-60) y dos semanas después. En el caso del Se, consistió en la pulverización de una solución acuosa de 10 g de Se ha^{-1} , aplicado en forma de Na_2SeO_4 disuelto en un volumen de 800 L ha^{-1} . En el caso del Zn, consistió en la pulverización de una solución acuosa de 4 kg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ha^{-1} disueltos, también, en 800 L ha^{-1} aplicado a última hora del día siguiendo la metodología descrita por Cakmak et al. (2010). En las parcelas en las que los dos tratamientos coincidían, ambos elementos se disolvieron juntos en el mismo volumen de 800 L ha^{-1} .

La superficie de la parcela elemental fue de 15m² (5m x 3m).

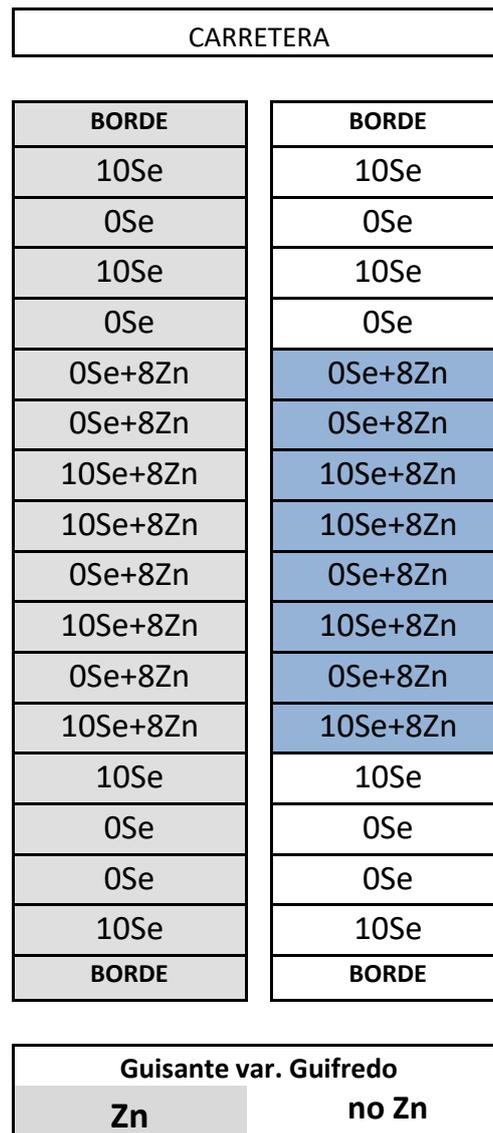


FIGURA 4.2. Esquema del diseño del ensayo a nivel de campo.

4.5. Determinaciones realizadas

Para cada una de las parcelas se midió el rendimiento de biomasa, contenido en proteína, fibra ácido y neutro detergente, contenido en lignina y concentración de nutrientes en el forraje (Se, Zn, Ca, Fe y Mg).

4.5.1. Rendimiento

El rendimiento se calculó, a partir de las muestras recogidas con unos marcos de 0,5x0,5m. En primer lugar, las muestras se lavaron para eliminar posibles restos de productos

químicos. Después se secó la muestra en estufa a 60 °C hasta peso constante. Y, por último, se pesó la muestra.

4.5.2. Contenido en proteína

El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldhal (Método 984.13; AOAC, 1990), en el cual se calcula la cantidad de N presente en la muestra y se extrapola a cantidad de proteína. Este método consta de tres etapas:

1. Etapa de digestión: tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición que convierte el N orgánico en ión amonio.
2. Etapa de destilación: se alcaliniza la muestra digerida y el N se desprende en forma de amoníaco. El amoníaco destilado se recoge sobre un exceso de ácido bórico.
3. Etapa de valoración: La cuantificación del N amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ión borato formato, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados.

4.5.3. Fibra neutro detergente

La fibra neutro detergente es el material insoluble en una solución detergente neutra que está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Para su cálculo, se utilizaron los siguientes reactivos: solución de Detergente Neutro, alfa-amilasa, sulfato sódico y acetona. El procedimiento, facilitado por el fabricante de los equipos (ANKOM) consta de 6 pasos:

1. Preparación de la muestra: pesada de 0,5 g de muestra seca y molida, colocación dentro de la bolsa de filtración y sellado de la misma.
2. Añadir 2000 ml a temperatura ambiente de la solución de Detergente Neutra al recipiente de digestión, 20 g de sulfito sódico y 4 ml de enzima alfa-amilasa.
3. Colocación de las muestras en el suspensor junto con la solución de Detergente Neutro, el sulfito sódico y la alfa-amilasa durante 75 minutos.
4. Lavar la muestra 3 veces con agua destilada. Quitar la muestra del suspensor y eliminar el exceso de agua con suavidad.

5. Por último, lavado con acetona, y dejar que se evapore. Una vez secas al aire libre, se introducen en la estufa a 105° C durante, al menos, 2 horas.
6. Cálculo del % de FND. Expongo la fórmula a continuación:

$$\%FND = 100*(W3 - (W1*C1))/W2$$

siendo:

W1: Peso de la bolsa

W2: Peso de la muestra

W3: Peso final de la bolsa y de la fibra.

C1: corrección del blanco de la bolsa (peso seco final de la bolsa en la estufa/ peso de la bolsa antes de entrar en la bolsa).

4.5.4. Fibra ácido detergente

Los reactivos utilizados para el cálculo de la fibra ácido detergente fueron: solución Acido Detergente y Acetona. Los pasos hasta la obtención del % FAD son:

1. Preparación de la muestra: siguiendo el mismo procedimiento que para la FND.
2. Añadir 2000 ml a temperatura ambiente de la solución de Detergente Ácida al recipiente de digestión.
3. Situar el suspensor con las muestras en el interior del depósito de digestión con la solución y agitar durante 60 minutos.
4. Lavar la muestra tres veces con agua destilada. Quitar la muestra del suspensor y eliminar el exceso de agua con suavidad.
5. Por último, lavado con acetona, y dejar que se evapore. Una vez secas al aire libre, se introducen en la estufa a 105° C durante, al menos, dos horas.
6. Cálculo del % de FND. Expongo la fórmula a continuación:

$$\%FAD = 100*(W3 - (W1*C1))/W2$$

siendo:

W1: Peso de la bolsa

W2: Peso de la muestra

W3: Peso final de la bolsa y de la fibra.

C1: corrección del blanco de la bolsa (peso seco final de la bolsa en la estufa/ peso de la bolsa antes de entrar en la bolsa).

4.5.5. Contenido en lignina

Para el cálculo del contenido de lignina en la muestra, se utilizó como reactivo ácido sulfúrico y se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Se cogen las mismas muestras que usamos para la fibra.
2. Añadir 250 ml de ácido sulfúrico al 75%. Situar los vasos de precipitados en el interior de donde está las muestras con ácido sulfúrico.
3. Agitar cada media hora durante tres horas.
4. Lavar con agua.
5. Lavar con acetona.
6. Completar secado en estufa a 105 °C.

4.5.6. Peso de cenizas

Para calcular el peso de las cenizas, se procedió según el método oficial AOCS Ba 5a-49 (1997). Se colocaron las muestras en un crisol de porcelana con la bolsita doblada y se situaron en el horno Mufla durante tres horas a 525 °C. Al día siguiente se pesaron las muestras.

4.5.7. Contenido de nutrientes en el forraje

Se llevaron a cabo las determinaciones de: Se, Zn, Ca, Mg y Fe. En primer lugar, se procedió a acondicionar las muestras utilizando un molino de bolas de ágata (Retch PM 400 mill) para obtener muestras molidas a un diámetro inferior a 300 µm. La digestión ácida se realizó siguiendo el método propuesto por Zhao et al. (1994). Se utilizó 0,4 g de cada muestra con ácido nítrico ultrapuro concentrado (6 ml) y peróxido de hidrógeno al 30% peso/volumen (2 ml) siguiendo un protocolo de digestión en vaso cerrado asistida por microondas (Mars X, CEM Corp, Matthews, EE.UU.) y diluido con agua ultra pura (25 ml) (Adams et al., 2002). Previo a su uso, los vasos utilizados fueron meticulosamente lavados con ácido, mientras que para asegurar la calidad, se incluyeron en cada lote un blanco y una muestra estándar (materia vegetal procedente del tomate, NIST 1573a) como elementos de control. Las concentraciones totales de los nutrientes en las muestras digeridas fueron determinadas utilizando un espectroscopio de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Agilent

Technologies, Santa clara, EE.UU.) operando en modo gas hidrógeno. Todos los resultados se mostraron haciendo referencia al contenido en materia seca. Estas determinaciones se realizaron en los laboratorios del Servicio de Analítica Elemental y Molecular de la Universidad de Extremadura (SAEM).

4.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos (rendimiento en biomasa, proteína, FAD, FND, lignina, cenizas y los nutrientes Zn, Se, Ca, Fe y Mg) fueron analizados mediante el programa estadístico Statistix 8.10 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA, 2003). Se realizó un análisis de la varianza ANOVA de dos vías estudiando el tratamiento con Zn (NoZn, Zn50S, Zn8F y Zn50S+8F), la aplicación de Se (NoSe y 10Se) y su interacción en el modelo. Para la comparación de medias se utilizó el test de Fisher de mínima diferencia significativa ($P < 0,05$). La mínima diferencia significativa para la comparación de los diferentes tratamientos y sus interacciones fue calculada utilizando los errores estándar sugeridos por Gómez y Gómez (1984).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

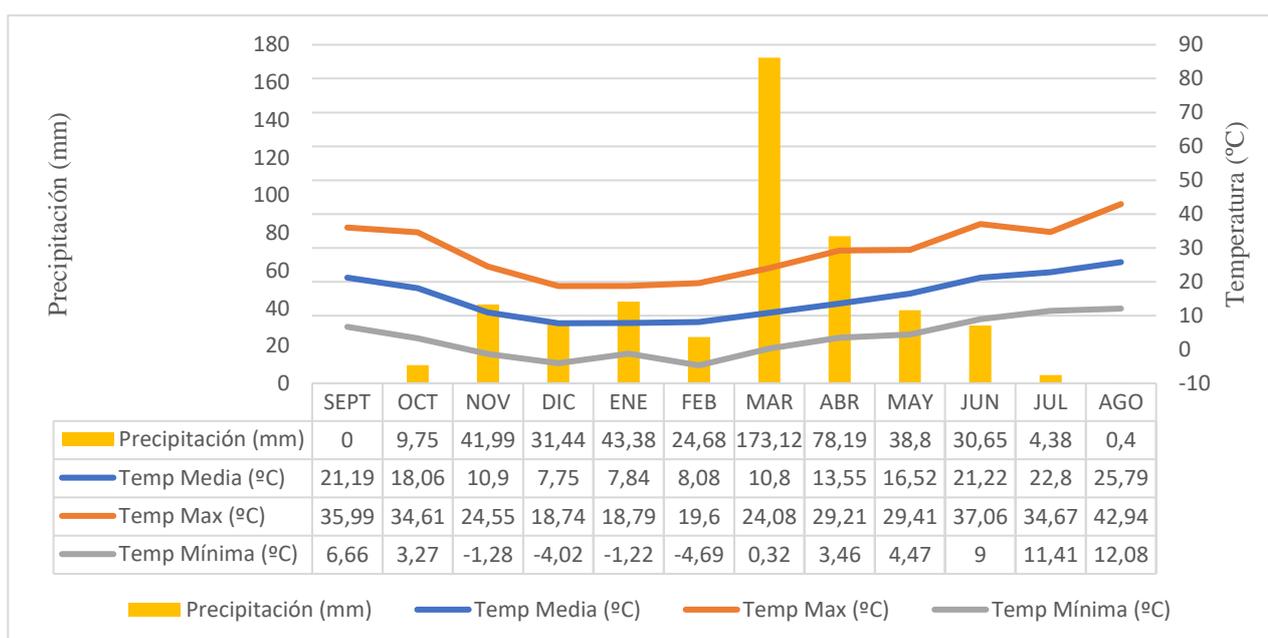
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Condiciones climáticas

Son múltiples los factores que afectan a los valores nutritivos de las leguminosas forrajeras anuales, entre los cuales se incluyen: factores climáticos, estado de crecimiento, proporción de hojas, proporción de tallos, tiempo de corte, daños por plagas y enfermedades, características del suelo y crecimiento de malas hierbas (Tekeli y Ates, 2006). En concreto, las variables climáticas afectan en gran medida al desarrollo de los cultivos. De forma directa, la precipitación es esencial para la germinación y el desarrollo de las plantas, la temperatura es también un factor clave, pues, las semillas necesitan una acumulación de grados día⁻¹ para su germinación y tienen unas temperaturas mínimas, óptimas y máximas para su desarrollo, también la humedad, dirección del viento, la radiación, etc. influyen en los cultivos. De forma indirecta, las variables climáticas influyen en la presencia de plagas, en la disponibilidad de nutrientes, en la calidad del suelo, etc. (Garau et al., 2000)

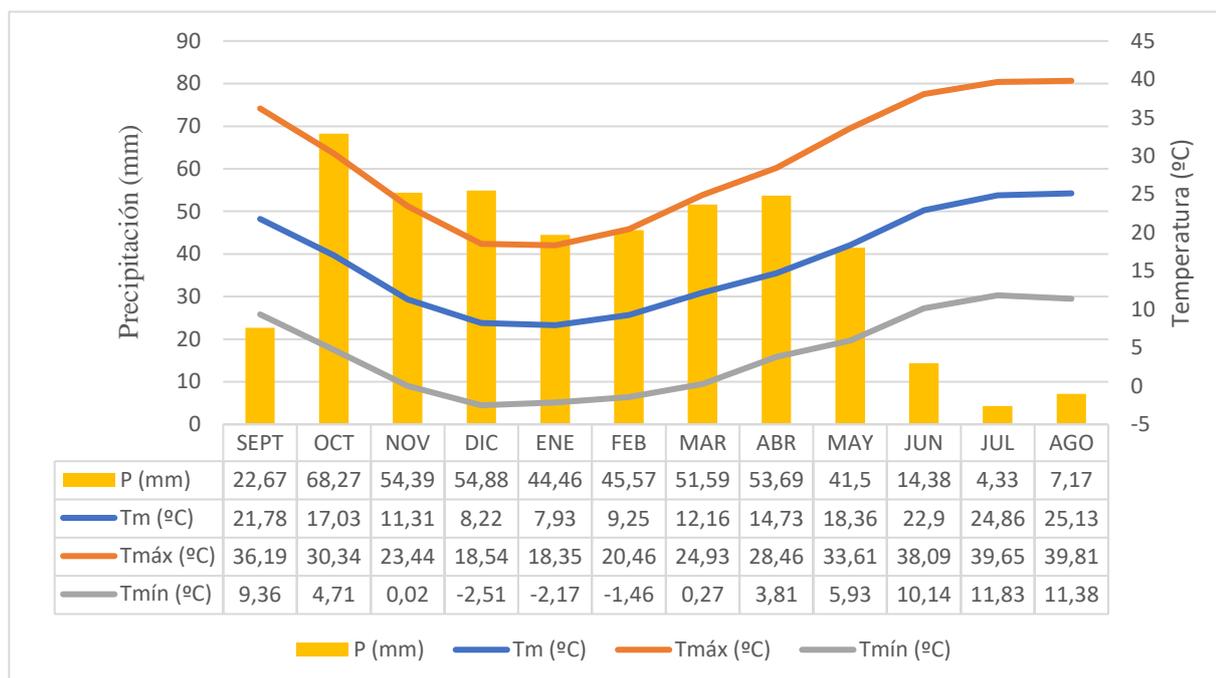
A continuación, en la Figura 5.1 se muestra la precipitación mensual, así como la temperatura máxima, media y mínima mensual durante el ciclo de cultivo. Los datos fueron tomados de la estación climática “Bercial”, por ser la más cercana a la parcela donde se llevó a cabo el ensayo. La Figura 5.2. muestra la media desde 1998.

FIGURA 5.1. Datos de precipitación (mm), temperatura media (°C), temperatura máxima (°C) y temperatura mínima (°C) durante el curso 2017/18.



Fuente: Servicio entero (Sistema de Información Climática para el Regadío, 2018)

FIGURA 5.2. Datos medios de precipitación (mm), temperatura media (°C), temperatura máxima (°C) y temperatura mínima (°C) desde junio 1998.



Fuente: Sistema de Información Climática para el Regadío, (2018)

La precipitación total acumulada durante el ciclo de cultivo fue de 477 mm, la cual es ligeramente superior a la media de los últimos 20 años de la zona (454 mm). En comparación con la media de 20 años, el otoño fue bastante seco, con 52 mm, siendo la media 178 mm; en invierno, la precipitación disminuyó 42 mm respecto al valor medio; sin embargo, en primavera (marzo, abril, mayo), la precipitación fue de 290 mm que, en comparación con la media de 20 años fue superior en 182 mm (Figuras 5.1 y 5.2).

Respecto a la temperatura media, tuvo su valor más bajo en diciembre (7,8 °C) y alcanzó su máximo en el mes de julio (22,8 °C), momento en que se realizó la recolección total. Respecto a la media de los 20 años, las temperaturas medias fueron ligeramente más altas en todos los meses, por ejemplo, diciembre tuvo una temperatura media de 8,2 °C y julio de 24,9 °C (Figuras 5.1 y 5.2).

La temperatura máxima durante el ciclo de cultivo tuvo una evolución muy similar a la temperatura media, como se puede apreciar en las Figura 5.1 y 5.2. En comparación con la media de los 20 años, se aprecia un aumento en los meses de otoño e invierno.

Observando los valores de temperatura mínima, sabemos que el periodo de heladas (temperatura < 0 °C) está comprendido entre los meses de noviembre y febrero, siendo la

temperatura más baja en febrero (-4,7 °C). Las temperaturas fueron más extremas en el ciclo de cultivo 2017/18, respecto a la media de los 20 años, siendo el valor más bajo de temperatura mínima diciembre con -2,5 °C. También, en este año de estudio, el periodo de heladas fue de 4 meses, un mes más que la media de 20 años, a pesar de que la tendencia es a la disminución del periodo de heladas (Figuras 5.1 y 5.2).

Como hemos visto en este análisis climático, la época más desfavorable del año comprende desde final de primavera al verano, provocando la necesidad de suplementar externamente al ganado extensivo (Otal et al., 2009). Este periodo difícil unido a que la dieta del ganado que pasta en zonas semiáridas de clima mediterráneo es muy deficiente en proteína, ya que esta se compone, según Caballero (2001), de aproximadamente 570 kg ha⁻¹ de paja y 90 kg ha⁻¹ de grano sin cosechar, han llevado a que algunos investigadores propongan la introducción de leguminosas de invierno como cultivo de rotación junto con los cereales de secano. Esto ofrece ventajas como la interrupción de ciclos de las enfermedades de los cereales, la reducción de especies no deseadas, así como la mejora de la fertilidad y estructura del suelo (Howieson et al., 2000), además de hacer un aprovechamiento más eficaz del agua de lluvia. Son varios los investigadores (Pala et al., 2007; Ryan et al., 2008) que han mostrado que las rotaciones de gramíneas junto con leguminosas tienen un efecto significativo sobre la cantidad y calidad, tanto en la paja como en el grano de los cereales con los que se rotan. Según estos estudios, estos sistemas de rotación no solo aportan una producción sostenible de los cultivos, sino que además, con ello, se consigue un mayor aprovechamiento de la precipitación.

5.2. Características edafológicas de la parcela

De acuerdo con los datos obtenidos de las muestras tomadas antes de la implantación del ensayo (Tabla 5.1), la textura que presenta el suelo es franco-arcillosa la cual se considera fina con un pH de $6,4 \pm 0,02$ (valor medio \pm error estándar) el cual se considera un pH ligeramente ácido. La conductividad eléctrica es de $1\ 321,4 \pm 24,04 \mu\text{S cm}^{-1}$ la cual se considera muy ligeramente salina y sus efectos sobre los cultivos son despreciables (USDA, 1999).

TABLA 5.1. Valores de los parámetros edafológicos de la zona de ensayo

| Parámetros físico-químicos | Valor medio y desviación típica |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Textura | Franco - arcillosa |
| pH (H ₂ O) | 6,4 ± 0,02 |
| Conductividad eléctrica (μS cm ⁻¹) | 1321,4 ± 24,04 |
| Materia orgánica (%) | 1,31 ± 0,09 |
| Nitrógeno total (%) | 0,12 ± 0,007 |
| Fósforo asimilable (g P kg ⁻¹) | 4,9 ± 0,05 |
| Potasio asimilable (meq K 100g ⁻¹) | 0,82 ± 0,02 |
| Calcio intercambiable (meq Ca 100g ⁻¹) | 6,23 ± 0,67 |
| Sodio intercambiable (cmol Na kg ⁻¹) | 0,26 ± 0,01 |
| Selenio extractable (μg Se kg ⁻¹) | 1,27 ± 0,01 |
| Zinc - DTPA (mg Zn kg ⁻¹) | 0,38 ± 0,08 |
| Magnesio intercambiable (meq Mg 100g ⁻¹) | 3,72 ± 0,37 |

El N total expresado en % es de $0,12 \pm 0,007$ y el contenido en materia orgánica en % es de $1,31 \pm 0,09$ que es un contenido muy bajo, característico de zonas agrícolas (Garrido, 1993). La capacidad de intercambio catiónico es de $11,37 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$ de suelo, la cual se considera baja y el suelo pobre en nutrientes.

La concentración de Se en el suelo es el principal factor determinante de la concentración de Se en las plantas (Hawkesford y Zhao, 2007). Basándonos en la clasificación descrita por Tan (1989), el suelo donde el presente estudio fue realizado posee una concentración de Se disponible de $1,27 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabla 5.1), que se considera como muy deficiente en este nutriente (Stroud et al., 2010). Esta concentración de Se disponible es inferior a la encontrada por López-Bellido et al. (2011) en suelos del suroeste de la Península Ibérica. Se ha visto que para producir cultivos con un nivel mínimo aceptable de Se para la nutrición humana, el Se disponible en suelo debe estar por encima de $27 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Stroud et al., 2010) por lo que los cultivos crecidos en la zona de ensayo van a ser deficientes en Se para los animales y humanos.

Respecto al contenido de Zn, el rango crítico en el suelo se ha establecido entre 0,5 y 2 mg Zn kg⁻¹ de suelo para el Zn-DTPA (Sims y Johnson, 1991). Nuestro suelo tiene un contenido de $0,38 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ (Tabla 5.1), por lo que se considera deficiente. Bajo estas condiciones de baja disponibilidad, un programa de biofortificación puede ser un buen remedio para aumentar la concentración de Zn en los cultivos crecidos en estos suelos

deficientes (Poblaciones y Rengel, 2016). Por ello, en nuestro estudio aplicamos una dosis de 50 kg ha^{-1} de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Poblaciones y Rengel (2016) en un ensayo de invernadero sobre guisante biofortificado con Zn vieron aumentada la concentración de este en el suelo 3,7 veces aplicando $4 \text{ mg de ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O kg}^{-1}$ de suelo y 5,6 veces con $8 \text{ mg de ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O kg}^{-1}$ de suelo, lo que equivale a 25 y $50 \text{ kg de ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O ha}^{-1}$. Zao et al. (2013) aplicaron tratamientos de Zn en el suelo y combinando la aplicación al suelo con la foliar aumentando la concentración de Zn en suelo entre 3 y 3,7 veces la concentración inicial. Sin embargo, este aumento de la concentración en suelo no es permanente, Brennan (2001) encontró que a los 13 años de la aplicación había disminuido un 50% la concentración de Zn en suelo. Cakmak et al. (2010), por su parte, encontraron que una aplicación de $28 \text{ kg de Zn ha}^{-1}$ como sulfato de Zn era suficiente para corregir la deficiencia de Zn en el trigo de 4 a 6 años. Por la importancia de clarificar la duración del efecto de la aplicación de Zn en la zona de estudio, este punto se clarificará repitiendo este ensayo en futuras campañas.

5.3. Rendimiento en biomasa

El análisis de la varianza muestra como la aplicación de Se ($P < 0,05$), la de Zn ($P < 0,001$) y la interacción Se*Zn ($P < 0,05$) influyeron significativamente sobre el rendimiento en biomasa (Tabla 5.2).

TABLA 5.2. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) del rendimiento de biomasa del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Fuente | GL | Rendimiento |
|--------------|----|-------------|
| Selenio | 1 | 7,33* |
| Zinc | 3 | 15,81*** |
| Selenio*Zinc | 3 | 3,02* |

*Significación a un 0,05 nivel de probabilidad

***Significación a un 0,001 nivel de probabilidad

Como se puede apreciar en la Tabla 5.3. los resultados obtenidos muestran un rendimiento medio de forraje de $8\ 860,47 \text{ kg ha}^{-1}$, valor que duplica y triplica el obtenido en otros ensayos de guisante forrajero como los llevados a cabo por el Instituto Tecnológico Agrario de la Junta de Castilla y León en la campaña 2005/06. En estos ensayos evaluaron el rendimiento, entre otras características, de distintas variedades de guisante forrajero de

siembra otoñal en algunas provincias españolas, por ejemplo, en Burgos se alcanzó un rendimiento medio de 2 784 kg ha⁻¹, en Palencia de 1 621 kg ha⁻¹ y en Valladolid 2 716 kg ha⁻¹ (Provedo y Caminero, 2007). Los altos valores de rendimiento alcanzados en nuestro ensayo pudieron ser debidos a la uniformidad de las precipitaciones a lo largo del ciclo de cultivo y, sobre todo, a la excepcionalidad en las precipitaciones primaverales, en las que, solamente en el mes de marzo cayeron 173 mm, precipitación muy superior a la media de la zona. En cambio, en el ensayo llevado a cabo en Castilla y León en la campaña 2005/06, las altas precipitaciones se dieron en el mes de octubre (110 mm) antes de la siembra, siendo el resto del año excesivamente seco. Otro ensayo llevado a cabo por GENVCE durante las campañas 2007/08 y 2008/09 en distintas comunidades autónomas, entre las que está Extremadura, obtuvieron unos rendimientos medios de 3 363 kg ha⁻¹ de forraje al 14% de humedad, en concreto, la variedad Guifredo utilizada también en este ensayo obtuvo 3 251 kg ha⁻¹, es decir, 5 600 kg ha⁻¹ menos que nuestro ensayo (GENVCE, 2010). Del mismo orden son los resultados obtenidos por un estudio de la Universidad de Sevilla, con 3 000 kg ha⁻¹ de forraje (Oliver et al., 2006). La diferencia es que en la campaña en que se realizó cayeron 277 mm a lo largo del ciclo de cultivo, mientras que en nuestro ensayo fueron 477 mm.

TABLA 5.3. Efecto de la aplicación de Se y de Zn sobre el rendimiento de biomasa de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Tratamiento | Rendimiento (kg ha⁻¹) |
|--------------------------|-----------------------------------------|
| No-Se | 8 465,2 b |
| 10 g Se ha ⁻¹ | 9 255,7 a |
| No-Zn | 7 969,7 b |
| Zn Suelo | 9 967,8 a |
| Zn Foliar | 7 752,1 b |
| Zn Suelo+Foliar | 9 752,3 a |

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

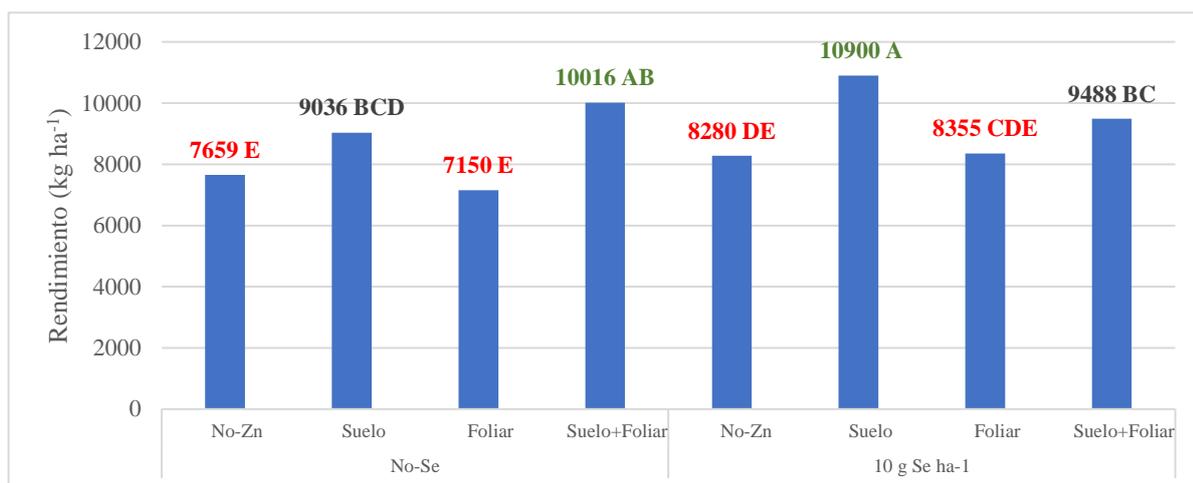
La aplicación de Se influyó significativamente en el rendimiento mostrando diferencias significativas a favor de la aplicación de 10 g Se ha⁻¹ en unos 800 kg ha⁻¹. Un estudio de biofortificación con Se en guisante forrajero llevado a cabo en Hungría bajo condiciones de atmósfera protegida (invernadero) obtuvo a dosis bajas (1 mg Se kg⁻¹ suelo)

un incremento de los componentes del rendimiento (longitud de la raíz, longitud de brote, número de vainas, número de semillas así como el peso seco de los distintos órganos vegetales), sin embargo, a partir de 3 mg Se kg⁻¹ suelo se observó la disminución del crecimiento de raíces, tallos y hojas (Garousi et al., 2007). Esto podría ser debido al efecto dual del Se en la planta (beneficioso o tóxico), en función de la concentración en que se suministre. Poblaciones et al. (2013) obtuvieron resultados similares respecto a la relación concentración de Se y rendimiento, en este caso se estudió el rendimiento de grano (kg ha⁻¹) a diferentes aplicaciones de Se (0, 20, 40 y 80 g Se ha⁻¹), y obtuvieron un incremento del rendimiento del grano hasta la concentración de 40 g ha⁻¹ de Se. Otros autores relacionan la toxicidad del Se con la presencia de azufre (S). Si el cultivo dispone de la cantidad suficiente de S, la aplicación de Se tiene un efecto positivo en el cultivo con pequeñas dosis, como la nuestra de 10 g Se ha⁻¹, en cambio, si el S no está muy presente en el medio de cultivo el Se interfiere en la ruta metabólica del S produciendo toxicidad en el cultivo (Hajiboland y Amjad, 2007). Esta podría ser la causa del efecto positivo del Se en el rendimiento del guisante en nuestro estudio.

En los tratamientos con Zn se aprecian diferencias significativas entre la aplicación de Zn al suelo, tanto de forma aislada (9 967,8 kg ha⁻¹) como en combinación con la aplicación foliar (9 752,3 kg ha⁻¹), y la no aplicación al suelo, es decir, en los tratamientos No-Zn (7 969,7 kg ha⁻¹) y Foliar (7 752,1 kg ha⁻¹) (Tabla 5.3). El incremento entre la no aplicación de Zn y la aplicación al suelo de forma aislada fue de un 25,07% y respecto a la combinada Suelo+Foliar fue de un 22,36%. Mourinho et al. (2015) en un ensayo llevado a cabo en Lisboa con trigo harinero, en el que calcularon el rendimiento de biomasa y de grano, el tratamiento con Zn aplicado al suelo y el tratamiento combinado Suelo+Foliar elevaron el rendimiento en grano un 265% y 250%, respectivamente, respecto al control y el rendimiento de biomasa lo aumentó un 109% y un 92%. Otro estudio en trigo harinero llevado a cabo bajo condiciones mediterráneas obtuvo en los tratamientos con aplicación de Zn al suelo un incremento del rendimiento de grano entre 212 – 350 kg ha⁻¹ o, lo que es lo mismo, entre 6,5 – 10,8% (Gómez-Coronado et al., 2017). También, Poblaciones y Rengel (2016) encontraron que el tratamiento de Zn al suelo de entre 4 y 8 mg ZnSO₄·7H₂O kg⁻¹ aumentó significativamente en todos los parámetros estudiados de raíces, brotes y granos con una significación del 99,9% en la mayoría de ellos; por el contrario, no encontraron estas diferencias en el tratamiento Zn Suelo+Foliar. Aunque los guisantes forrajeros se clasifican como que tienen una sensibilidad relativamente baja a la deficiencia de Zn (Alloway, 2008),

el efecto tan positivo que se observa con la aplicación de Zn al suelo es debido a que, al ser nutriente esencial para los cultivos y, a la vez, estar en cantidades muy reducidas en el suelo de estudio, $0,38 \text{ mg DTPA-Zn kg}^{-1}$ suelo, el crecimiento de la planta depende completamente de la aplicación de abonos y fertilizantes que contienen Zn (Alloway, 2008; Gómez-Coronado et al., 2017; Poblaciones y Rengel, 2017).

FIGURA 5.3. Efecto de la interacción de Se y de Zn sobre el rendimiento de biomasa de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.



*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

En la Figura 5.3 vemos el efecto de la interacción Se*Zn sobre el rendimiento. El valor más alto se obtuvo cuando se aplicó a la vez tanto el tratamiento con Se y la aplicación de Zn al suelo aunque sin diferencias significativas en la aplicación Suelo+Foliar sin aplicar Se, destacando principalmente todos los tratamientos en los que se aplicó Zn al suelo, sin verse influido tanto por la aplicación de Se. El rendimiento más bajo se obtuvo cuando la aplicación de Zn fue foliar o no se aplicó Zn, independientemente de la aplicación de Se. Poblaciones y Rengel (2016) en los parámetros de rendimiento que estudiaron (peso seco de raíz, peso seco de brotes, número de vainas por planta y número de granos por vaina) no vieron diferencias significativas en la interacción Se*Zn.

5.4. Contenido proteico y contenido de cenizas

El análisis de la varianza muestra como la aplicación de Se influyó significativamente en el contenido en proteína, pero no en el contenido de cenizas. La aplicación de Zn influyó de manera muy significativa ($P < 0,001$) en el contenido proteico, también mostró diferencias el contenido de cenizas entre tratamientos, aunque ésta no fue tan fuerte ($P < 0,05$). La interacción Se*Zn influyó significativamente sobre el contenido en cenizas, pero no sobre el contenido proteico. (Tabla 5.4).

TABLA 5.4. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) del contenido de proteína y cantidad de cenizas del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Fuente | GL | Proteína | Cenizas |
|--------------|----|----------|---------|
| Selenio | 1 | 9,05** | 3,95 |
| Zinc | 3 | 17,69*** | 3,16* |
| Selenio*Zinc | 3 | 0,86 | 3,24* |

*Significación a un 0,05 nivel de probabilidad

**Significación a un 0,01 nivel de probabilidad

***Significación a un 0,001 nivel de probabilidad

El contenido proteico de la semilla de las leguminosas ha sido estudiado y analizado por muchos investigadores, sin embargo, no son tantos los trabajos existentes en cuanto al contenido nutricional del forraje para alimento del ganado. Un estudio llevado a cabo en Cuba por Ates et al. (2010) caracterizó al guisante forrajero (*Pisum sativum* L.) como una leguminosa de alto contenido proteico dentro de esta familia, en este estudio el guisante presento un contenido proteico de 151,3 g kg⁻¹ de proteína bruta, obtenido diferencias significativas respecto al resto de especies estudiadas (*Trifolium resupinatum* var. *Typicum*, *T. alpestre* y *T. montanum*). En este estudio, se obtuvo un contenido en proteína medio de 17,73%, y por tanto mayor al encontrado por Ates et al. (2010).

La aplicación de Se sobre el contenido de proteínas parece influir negativamente, apreciándose una disminución del 2,9% (Tabla 5.5). Poblaciones et al. (2012) quienes estudiaron el efecto del selenito y selenato sobre el contenido proteico del grano de guisante, vieron que las parcelas tratadas con selenato tenían más contenido proteico (29,3%) que aquellas fertilizadas con selenito (28,5%). En cambio, la dosis de Se de 10 g ha⁻¹, al contrario que en nuestro estudio, no influyó en el contenido proteico del grano de guisante. En un ensayo llevado a cabo en invernadero donde también se estudió la influencia de diferentes

dosis de selenito y selenato sobre el contenido de dos selenoproteínas (selenocisteína y selenometionina) en raíz, brotes, vainas y grano, éstas fueron mayores con la aplicación de selenato, aunque también se encontró que el contenido proteico fue significativamente mayor con la aplicación de selenito respecto al control (Garousi et al., 2017). Este efecto negativo, de confirmarse en futuras campañas, puede desalentar a los agricultores ya que la biofortificación agronómica con Se llevaría implícito una pérdida ligera en la calidad de sus forrajes aunque quedaría compensado por el efecto positivo sobre el rendimiento en biomasa.

TABLA 5.5. Efecto de la aplicación de Se y de Zn sobre el contenido de proteína (%) y contenido de cenizas (%) de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Tratamiento | Proteína (%) | Cenizas (%) |
|--------------------------|---------------------|--------------------|
| No-Se | 17,99 a | 0,439 a |
| 10 g Se ha ⁻¹ | 17,47 b | 0,393 a |
| No-Zn | 17,84 b | 0,430 a |
| Zn Suelo | 17,03 c | 0,460 a |
| Zn Foliar | 18,71 a | 0,361 b |
| Zn Suelo+Foliar | 17,36 bc | 0,414 ab |

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

En cuanto a los tratamientos de Zn, la aplicación foliar fue la que mayor contenido proteico mostró presentando diferencias significativas respecto al resto de tratamientos. El tratamiento con Zn en suelo fue el que menos proteína acumuló observándose diferencias respecto al resto de tratamientos, siendo la aplicación foliar la que mayor contenido proteico presentó (Tabla 4.5). Poblaciones y Rengel (2016) también obtuvieron, en grano de guisante, mayor contenido proteico con el tratamiento foliar (9,7%), coincidiendo en que el peor tratamiento de cara a la acumulación de proteínas fue la aplicación de Zn exclusivamente al suelo. Gómez-Coronado et al. (2017) obtuvieron altos contenidos proteicos en grano de trigo con la aplicación foliar de Zn (9,73% de media), siendo mayor en el tratamiento Zn Suelo+Foliar (9,9%). Como indican nuestros resultados y los obtenidos por Gómez-Coronado et al. (2017) y Poblaciones y Rengel (2016), la aplicación de fertilizante de Zn en la etapa de inicio de floración e inicio de llenado de grano mejora significativamente el contenido

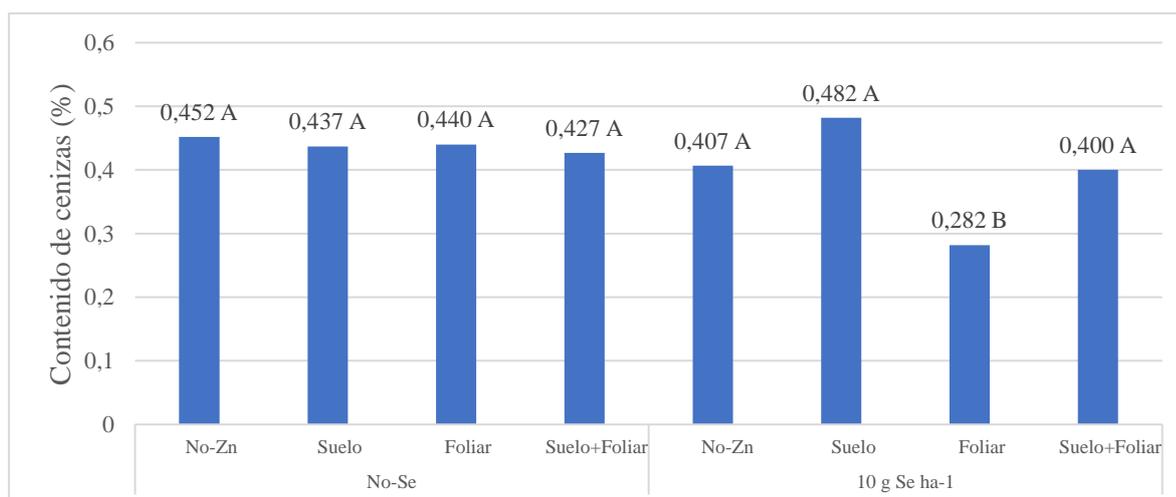
proteico. Esto podría ser debido al vínculo cercano encontrado entre los genes que afectan la acumulación de Zn del grano y el contenido de proteínas, de hecho, podrían tener la misma base genética (Cakmak et al., 2004, Ghasemi et al., 2013).

El contenido de cenizas no se vio influido significativamente por la aplicación de Se, aunque disminuyó el porcentaje en un 10% (Tabla 5.5). Con la aplicación de Zn, si se observaron diferencias significativas. Mientras la aplicación al suelo obtuvo el valor más alto y el mínimo la aplicación foliar (0,3613%), el tratamiento No-Zn y el combinado Suelo+Foliar se situaron en posiciones intermedias, con porcentajes de 0,4300% y 0,4138%, respectivamente (Tabla 5.5).

En la Figura 5.4 vemos la influencia de la interacción de Se*Zn sobre el contenido de cenizas. Estadísticamente son todos los valores iguales, a excepción del tratamiento Se + Zn Foliar en el que el porcentaje de cenizas fue menor.

Respecto al contenido de cenizas encontrado en otras leguminosas en Venezuela (6,31%), o el del residuo fibroso (planta desgranada) de *Pisum sativum* (5,7%) podríamos considerar bajo el obtenido en este ensayo (Alzueta y González, 1981; García et al., 2009).

FIGURA 5.4. Efecto de la interacción de Se y de Zn sobre el rendimiento de biomasa de guisante en el año agrícola 2017/ 2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.



*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

5.5. Fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y contenido en lignina (LAD)

El guisante, como algunas otras leguminosas, es reconocido como buena fuente de proteínas, pero también de almidón, vitaminas, minerales, compuestos fenólicos y fibra dietética. Es por ello, por lo que es considerado como un alimento multiuso y de alto valor nutritivo. Sin embargo, la fibra dietética en altas cantidades disminuye los parámetros de crecimiento de los animales (Tosh et al., 2013). Es, por ello, importante conocer estos parámetros en nuestro ensayo.

El análisis de la varianza llevado a cabo con los datos obtenidos de FND, FAD y contenido en lignina no resultaron influidos significativamente por ninguno de los tratamientos estudiados, es decir aplicación de Se o de Zn, ni por la interacción entre ambos (Tabla 5.6).

TABLA 5.6. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) de la fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y contenido de lignina del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Fuente | GL | FND | FAD | LAD |
|---------------|-----------|------------|------------|------------|
| Selenio | 1 | 0,02 | 0,08 | 0,23 |
| Zinc | 3 | 0,75 | 1,83 | 1,79 |
| Selenio*Zinc | 3 | 1,60 | 0,35 | 0,36 |

TABLA 5.7. Efecto de la aplicación de Se y de Zn sobre la fibra neutro detergente (%), fibra ácido detergente (%) y contenido en lignina (%) de guisante en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Tratamiento | FND | FAD | LAD |
|--------------------------|------------|------------|------------|
| No-Se | 54,18 a | 36,76 a | 9,30 a |
| 10 g Se ha ⁻¹ | 54,38 a | 37,01a | 9,13 a |
| No-Zn | 55,81 a | 37,75 a | 9,721 a |
| Zn Suelo | 53,09 a | 35,66 a | 8,86 a |
| Zn Foliar | 54,14 a | 38,02 a | 9,53 a |
| Zn Suelo+Foliar | 54,08 a | 36,11 a | 8,75 a |

El contenido medio de FND de la planta completa de guisante fue de 54,28%. En un ensayo en Venezuela en el que se estudió el valor nutricional de distintas leguminosas de los géneros: *Pithecellobium*, *Gliricidia*, *Leucaena*, *Acacia*, *Bahuhinia*, *Cassia* y *Pentaclethra* obtuvieron un contenido medio de FND de 40,43% en las especies estudiadas, lo que supone un 13,85% menos que en nuestro ensayo (García et al., 2009). Alzueta y González (1981) estudiaron el valor nutricional del residuo fibroso de guisante (planta desgranada) bajo condiciones mediterráneas y obtuvieron un porcentaje de FND de 55,7%, valor muy similar al nuestro, un % de FAD de 45,2 el cual es un 8,3% más alto al que obtuvimos en nuestro ensayo y un contenido en lignina de 13% el cual es 3,8% mayor al nuestro. En este mismo estudio se compararon los resultados de la planta desgranada de guisante con la alfalfa y la paja de trigo, y saltó a la vista que el guisante tenía una composición nutricional intermedia entre estos dos últimos respecto a la FND, FAD y celulosa. El contenido de celulosa en guisante fue de 31,06%, mientras que en la alfalfa fue de 27,5% y en la paja de trigo 33,48%. Ates et al. (2010) estudiaron el contenido de fibra en leguminosas forrajeras anuales en estado de floración, entre ellas guisante, los resultados para esta especie fueron un 42,69% de FND y un 31,42% de FAD, valores más reducidos a los obtenidos en este ensayo. Otro estudio de Moreno et al. (1976) también analizó el contenido de fibra en la planta de guisante, obteniendo contenidos de fibra mucho menores: FND (29,55%), FAD (26,1%), celulosa (19,57%) y lignina (7,4%), lo que se explica a que se recolectó mucho antes, en floración. Un estudio llevado a cabo en condiciones semiáridas de secano mediterráneo evaluó el contenido de proteína bruta, FND y FAD en guisante forrajero en los meses de abril, junio y julio, los resultados mostraron un aumento de la FND (6%) y de la FAD (9%) entre los meses de abril y julio, así como una disminución de la proteína de un 7%, lo que pone en evidencia el aumento de los contenidos en fibra a medida que evoluciona el ciclo.

Ante nuestros resultados y, comparándolos con los demás estudios, podríamos concluir que recolectando antes de que suban mucho las temperaturas se obtienen contenidos de fibra menores y aumenta la calidad del forraje producido, ya que un menor contenido de fibra neutro detergente (FND) o fibra ácido detergente (FAD) aumenta la digestibilidad del forraje.

No obstante, los niveles de FND y FAD, así como el bajo contenido en lignina ponen de manifiesto que se trata de un alimento especialmente apto para rumiantes y teniendo en

cuenta los altos niveles de proteína que contienen, el forraje de guisante se puede considerar un alimento de calidad para rumiantes coincidiendo con Hubbard (2008).

5.6. Contenido en nutrientes

Como se aprecia en la Tabla 4.8, la concentración de Ca no se vio afectada de forma significativa por ninguno de los tratamientos de Se, Zn o su interacción. En cambio, el Fe y el Mg se vieron influidos por el tratamiento de Zn con un nivel de significación de $P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente. La concentración de Se se vio influida significativamente tanto por la aplicación de Se, por la de Zn así como por su interacción y en cuanto a la concentración de Zn, tanto la aplicación de Zn como la interacción Se*Zn influyeron significativamente sobre ella (Tabla 5.8).

TABLA 5.8. Análisis de la varianza (grados de libertad (G.L.) y estadístico F) del rendimiento de biomasa, contenido de proteína y cantidad de cenizas del forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Fuente | GL | Ca | Fe | Mg | Se | Zn |
|--------------|----|------|-------|----------|----------|----------|
| Selenio | 1 | 1,04 | 0,29 | 0,61 | 36,62*** | 0,8 |
| Zinc | 3 | 1,44 | 4,38* | 28,09*** | 4,89** | 30,35*** |
| Selenio*Zinc | 3 | 1,07 | 0,19 | 2,73 | 3,05* | 5,32** |

*Significación a un 0,05 nivel de probabilidad

**Significación a un 0,01 nivel de probabilidad

***Significación a un 0,001 nivel de probabilidad

Como se aprecia en la Tabla 5.9, la concentración de Ca no mostró diferencias significativas respecto a la aplicación de Se, sin embargo, con la aplicación de 10 g de Se ha⁻¹ aumentó en 5 917 mg la concentración de Ca por kg de forraje. Por el contrario, la aplicación de Zn disminuyó ésta, observándose una diferencia no significativa de más de 10 000 mg kg⁻¹ de Ca entre el tratamiento de No-Zn y el resto de los tratamientos. Aunque no hay diferencias entre tratamientos estadísticamente, algunos autores dicen que existe una relación antagonista entre Zn y Ca (Sanskriti, 2014). Poblaciones y Rengel (2016) y (2017) tampoco observaron diferencias significativas en la concentración de este nutriente cuando se realizó biofortificación de Zn. La concentración de Ca obtenido en otros forrajes como heno de gramíneas, sorgo o avena verde fue de 4 100, 3 200 y 3 000 mg kg⁻¹, respectivamente, valores más bajos que los obtenidos en este ensayo (Vidart, 1996), lo que pone de manifiesto que las leguminosas, en general, son plantas con un mayor contenido de Ca que las gramíneas.

Además, según NRC (2000) nuestro forraje cumpliría los requerimientos de Ca para bovinos de carne en todas las etapas de su ciclo reproductivo: crecimiento y engorde ($6\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$), gestación ($2\ 500\ \text{mg kg}^{-1}$) y lactancia ($3\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$).

Respecto a los valores de concentración de Fe, la aplicación de Se no influyó en esta. Sin embargo, la aplicación de Zn afectó negativamente al contenido de Fe observándose diferencias significativas con el tratamiento de Zn Suelo+Foliar que disminuyó la concentración de Fe en $88,99\ \text{mg kg}^{-1}$ y con el tratamiento Zn Foliar que disminuyó la concentración de Fe $78,98\ \text{mg kg}^{-1}$ respecto al tratamiento control en el que no se aplicó Zn, con una concentración de Fe de $228,17\ \text{mg kg}^{-1}$ (Tabla 5.9). Poblaciones y Rengel (2016) solo encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) cuando el Zn se aplicó al suelo. Según Mortimer (1999), la concentración de Zn adecuada para especies ganaderas se encuentra entre $50 - 200\ \text{mg kg}^{-1}$, lo que indica que todos los tratamientos cumplen con los requisitos alimentarios del ganado. Un aspecto a tener en cuenta es que el Fe tiene un impacto antagónico en la dieta del ganado sobre la absorción de cobre (Cu) que es, a menudo, un problema importante cuando se trata de equilibrar los oligoelementos minerales. Y, no solo eso, sino que otras muchas fuentes de ingredientes de otros nutrientes trazas están naturalmente contaminadas con Fe. En conjunto, la disminución de Fe en cultivos biofortificados con Zn, debido a que los niveles son adecuados, no deben suponer una preocupación para los ganaderos (Rasby et al., 2011).

El Mg se comportó de forma muy parecida al Fe ante la aplicación de Se y Zn. Con la aplicación de Se, disminuyó ligeramente la concentración de Mg, sin ser la diferencia significativa, mientras que con la aplicación de Zn disminuyó la concentración de Mg, siendo estas diferencias significativas (Tablas 5.8 y 5.9). Mientras que la concentración de Mg con el tratamiento No-Zn fue de $2\ 252,3\ \text{mg kg}^{-1}$, la media de los tratamientos cuando se aplicó el Zn fue de $1\ 711,86\ \text{mg kg}^{-1}$ de Mg, el valor mínimo se obtuvo cuando se aplicó el Zn en el suelo junto con la aplicación foliar $1\ 525,3\ \text{mg kg}^{-1}$ de Mg. Estos valores concuerdan con los obtenidos en otros estudios que indican que existe una relación antagonista entre Zn y Mg (Sanskriti, 2014). Poblaciones y Rengel (2016) también observaron diferencias significativas en la concentración de Mg en el grano de guisante ($P < 0,001$), pero únicamente en el tratamiento de Zn en suelo, no observando diferencias ni en el tratamiento foliar ni en el combinado Suelo+Foliar. Sin embargo, todos los tratamientos cumplen con las necesidades de algunas especies ganaderas, como pollos de engorde y gallinas ponedoras ($0,06 - 0,3\%$), y

cerdos (0,13 – 0,16%), aunque ninguno de los tratamientos cumple con las necesidades totales de caballos (0,39%) y vacas (0,25 – 0,35), en el caso del ganado ovino únicamente sus necesidades de Mg quedarían totalmente cubiertas con el tratamiento de No-Zn (Puls, 1988).

TABLA 5.9. Efectos de la aplicación de Se y de Zn sobre la concentración de Ca, Fe, Mg, Se y Zn por kg de forraje (M.S.) en el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.

| Tratamiento | Ca (mg kg ⁻¹) | Fe (mg kg ⁻¹) | Mg (mg kg ⁻¹) | Se (µg kg ⁻¹) | Zn (mg kg ⁻¹) |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| No-Se | 8 242 a | 186,21 a | 1 869,6 a | 51,87 b | 61,163 a |
| 10 g Se ha ⁻¹ | 14 159 a | 175,15a | 1 824,3 a | 206,61 a | 66,781 a |
| No-Zn | 21 601 a | 228,17 a | 2 252,2 a | 90,07 bc | 21,500 c |
| Zn Suelo | 8 419 a | 206,19 ab | 1 884,8 b | 76,47 c | 50,513 b |
| Zn Foliar | 7 809 a | 149,19 bc | 1 725,5 b | 198,10 a | 96,95 a |
| Zn Suelo+Foliar | 6 972 a | 139,18 c | 1 525,3 c | 152,31 ab | 86,925 a |

*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

En lo que se refiere al Se, su concentración en el forraje se vio afectada tanto por la aplicación de Se, por la de Zn y por la interacción entre ambas (Tabla 5.8). Para el tratamiento No-Se la concentración media fue de 51,87 µg Se kg⁻¹, valor inferior al obtenido por Poblaciones et al. (2013) (57 µg Se kg⁻¹) y superior al obtenido por Poblaciones y Rengel (2016) (38 µg Se kg⁻¹). La concentración de Se media en las parcelas donde éste se aplicó fue de 206,61 µg Se kg⁻¹, mientras que la concentración media de Se cuando no hubo aplicación foliar fue de 49,9 µg Se kg⁻¹, lo que supone una diferencia de 156,71 µg Se kg⁻¹ (Tabla 4.9) También la aplicación de Zn influyó significativamente en la concentración de Se, siendo la concentración media cuando no se aplicó Zn de 90,07 µg kg⁻¹, mientras que cuando si se aplicó, en cualquiera de las formas de aplicación, de 142,29 µg Se kg⁻¹, siendo la aplicación foliar la que provocó aumentos mucho mayores, de 2,2 veces en el caso de la aplicación solamente foliar y de 1,7 veces en la combinada suelo+foliar (Tabla 5.9).

Según Saha et al. (2016), los niveles recomendados de Se en distintas especies ganaderas oscilan entre 0,05-0,08 para gallinas ponedoras hasta 0,1-0,2 mg Se kg⁻¹ de

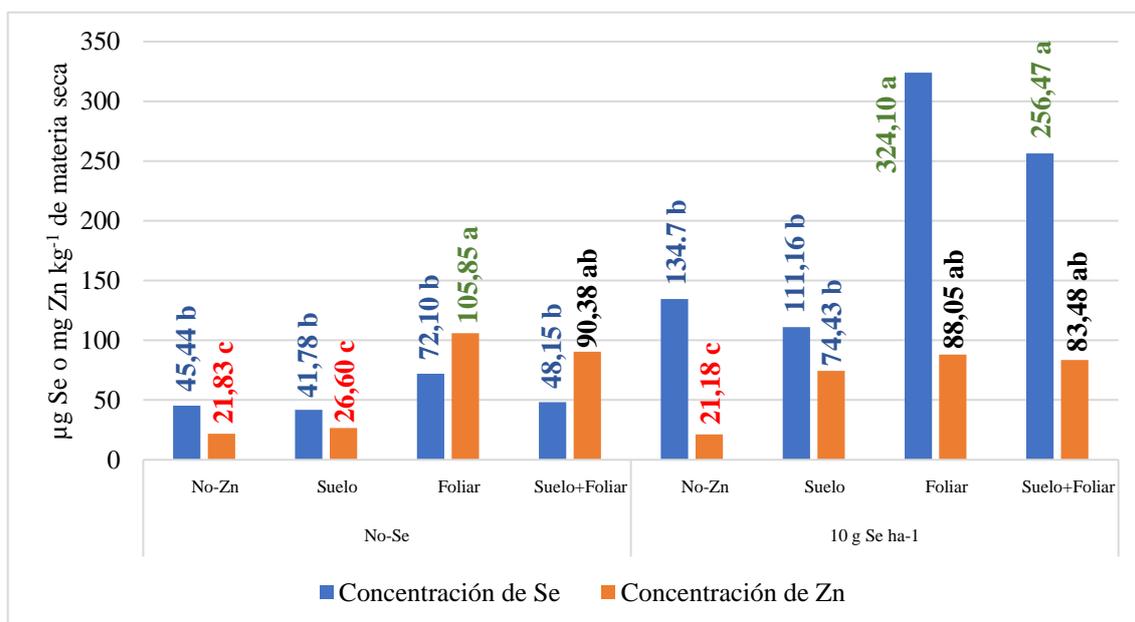
alimento para ganado vacuno de carne, ovino y equino, con excepción de las vacas lecheras y cerdos de cebo que llegan a necesitar $0,3 \text{ mg Se kg}^{-1}$ de alimento, siendo niveles tóxicos los superiores a 2 mg kg^{-1} . Por tanto, teniendo en cuenta los niveles obtenidos con este programa de biofortificación, de $0,21 \text{ mg kg}^{-1}$ de forraje aplicando 10 g Se ha^{-1} quedarían cubiertas el 100% de las necesidades de la mayoría de las especies ganaderas sin llegar a la toxicidad, a excepción de vacas lecheras y cerdos de cebo, en las que se cubrirían el 70%.

Hall et al. (2013) en un ensayo de biofortificación con Se, en forma de selenato sódico, llevado en Oregón (EEUU) en alfalfa para alimento del ganado vacuno con dosis de Se de 0, 22,5, 45, y 89 g Se ha^{-1} obtuvieron 0,07, 0,95, 1,55 y $3,26 \text{ mg Se kg}^{-1}$ de M.S. La ingesta calculada de Se a partir del heno de alfalfa fue de 0,4, 5,3, 8,7 y $18,2 \text{ mg Se cabeza}^{-1} \text{ día}^{-1}$, por lo que la fertilización de la alfalfa fue eficaz. Además la alimentación con heno de alfalfa fertilizado con Se fue efectivo para aumentar el peso corporal en los terneros, aquellos terneros que se alimentaron de alfalfa con la dosis de Se de 89 g Se ha^{-1} alcanzaron a las 7 semanas 265 kg, mientras que los que no recibieron Se en la dieta a las 7 semanas pesaban una media de 250 kg. Otro estudio llevado a cabo en Canadá aplicó Se en forma de selenato sódico junto con urea a una dosis de $3,4 \text{ kg fertilizante ha}^{-1}$ (34 g Se ha^{-1}). Las vacas de carne que pastaron en este forraje tenían concentraciones de Se en sangre de 186 ng ml^{-1} inmediatamente después del pastoreo, que se encontraban dentro del intervalo de referencia normal para las concentraciones de Se en sangre de vacas adultas según el laboratorio de diagnóstico de la Universidad Estatal de Michigan ($120 - 300 \text{ ng mL}^{-1}$) (Hall et al., 2011). Otro ensayo llevado a cabo en ovejas por Hall et al. (2009) comparó el uso de forraje biofortificado y un suplemento mineral de Se. Inmediatamente después del tratamiento, las concentraciones de Se en sangre total fueron significativamente más altas en ovejas que se habían alimentado de pastos biofortificados, $573 \pm 20 \text{ ng ml}^{-1}$, frente a las que recibieron el suplemento mineral, $286 \pm 20 \text{ ng ml}^{-1}$. Y la concentración fue aún mayor al final de los 9 meses ($97 \pm 7 \text{ ng ml}^{-1}$ vs. $61 \pm 7 \text{ ng ml}^{-1}$, respectivamente). Además, las concentraciones de Se en sangre total estuvieron dentro del intervalo de referencia normal ($150-500 \text{ ng ml}^{-1}$) durante un período de tiempo más prolongado en las ovejas alimentadas con forraje biofortificado (7 meses) en comparación con las ovejas que recibieron el suplemento mineral (4 meses). Este resultado es muy interesante ya que evidencia la mayor efectividad de la biofortificación frente a la suplementación.

Por cada gramo de Se aplicado por hectárea la concentración de Se aumentó 15,47 veces. En grano de guisante, Poblaciones et al. (2013) obtuvieron que, por cada gramo de Se ha^{-1} aplicado en forma de selenato sódico y selenito sódico, la concentración de Se aumentó a 148 y 19 $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ M.S., respectivamente. En cambio, en cebada de dos carreras este incremento fue menor 44 y 9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de M.S. con selenato sódico y selenito sódico, respectivamente (Poblaciones et al., 2013).

Estudiando la interacción Se*Zn, representada en la Figura 5.5 se observa como la aplicación combinada de 10 g Se ha^{-1} junto con la aplicación foliar de Zn, ya sea de forma aislada como combinando las aplicaciones suelo+foliar tienen un efecto sinérgico en la acumulación de Se en el forraje de guisante. Resultados similares fueron obtenidos por Poblaciones y Rengel (2018) en un ensayo de invernadero con guisante grano. Este hallazgo pone de manifiesto que la biofortificación combinada de ambos nutrientes es posible, lo que desde el punto de vista de los agricultores es muy positivo ya que los países extra que suponen la biofortificación no serían tres (uno de Se y dos de Zn) sino únicamente dos.

FIGURA 5.5. Efecto de la interacción aplicación de Se y de Zn sobre la concentración de Se ($\mu\text{g Se kg}^{-1}$) y de Zn (mg Zn kg^{-1}) en el forraje de guisante obtenido el año agrícola 2017/2018 bajo condiciones semiáridas Mediterráneas.



*Letras diferentes en cada tratamiento indican la existencia de diferencias significativas a $P < 0,05$ de acuerdo con la MDS.

En cuanto a la concentración de Zn, comparando los tratamientos No-Se y 10 g Se ha⁻¹, no se ven diferencias significativas, siendo la concentración media de Zn de unos 64 mg kg⁻¹. Para el tratamiento No-Zn fue de 21,5 mg kg⁻¹ de M.S., valor inferior que el obtenido por Poblaciones y Rengel (2016) en grano de guisante (34 mg kg⁻¹) y superior al obtenido por Gomez-Coronado et al. (2017) en grano de trigo. Cuando el Zn se aplicó al suelo aumentó la concentración en el forraje 25 mg kg⁻¹ respecto a la no aplicación de Zn. Esta diferencia fue todavía mayor en los tratamientos de aplicación foliar y suelo+foliar donde el incremento de la concentración de Zn fue de 75,45 y 65,45 mg kg⁻¹, respectivamente. Poblaciones y Rengel (2016) también encontraron un incremento de la concentración de Zn observando diferencias significativas en los tres tratamientos que realizaron: Zn-suelo (P<0,05), Zn-foliar (P<0,001) y Zn Suelo+Foliar (P<0,05). Gomez-Coronado et al. (2017) obtuvieron en trigo harinero bajo condiciones mediterráneas, al igual que en este ensayo, las mayores concentraciones de Zn en planta con los tratamientos Foliar (153,83 g ha⁻¹) y Foliar+Suelo (169,66 g ha⁻¹), siendo el tratamiento de no-Zn o control (57,66 g ha⁻¹) el que obtuvo valores más bajos.

Ante los resultados obtenidos y, según la clasificación llevada a cabo por Mortimer (1999), podemos considerar los tratamientos de Zn Suelo, Foliar y Suelo+Foliar adecuados para obtener alimentos adecuados en cuanto al contenido de Zn ya que están por encima de 30 mg kg⁻¹ y por debajo de 500 mg kg⁻¹, valor que se considera la concentración máxima tolerable para especies ganaderas. Por tanto, podemos considerar eficaz la biofortificación con Zn en guisante forrajero, teniendo en cuenta que la mayoría de los forrajes de alimento de ganado tienen concentraciones deficientes de Zn y que una deficiencia de este puede afectar la reproducción, la piel y los problemas de la pezuña y causar hinchazón de las articulaciones óseas o una curación lenta de las heridas. Además, las legumbres son generalmente más altas en Zn que las gramíneas (Rasby et al., 2011).

Además, se ha visto que existe una relación lineal entre la cantidad de Zn en suelo, en planta, en animales y en humanos. Shukla et al. (2016) obtuvieron una correlación alta entre grano de trigo y la concentración de Zn en suelo ($R^2=0,728$), entre Zn en suelo y paja de trigo para alimentación de ganado ($R^2=0,713$), entre Zn en sangre humana y Zn en grano de trigo ($R^2=0,875$), entre Zn en sangre humana y Zn en suelo ($R^2=0,661$), entre Zn en sangre animal y Zn en paja de trigo para alimento de ganado ($R^2=0,443$) y entre Zn en sangre animal y Zn en suelo de cultivo ($R^2=0,581$). En este estudio, el trigo se fertilizó tanto al suelo como foliarmente, la diferencia de concentración en el cultivo de este tratamiento respecto a las

parcelas no fertilizadas fue de $12,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de grano de trigo; con este grano se alimentó a ratas y se midió la concentración de Zn en sangre a los 0, 50 y 75 días obteniendo una diferencia entre tratamientos de 0,2, 6 y $6,7 \mu\text{g Zn mL}^{-1}$. Un estudio llevado a cabo en pollos de engorde en Eslovaquia con distintas dietas enriquecidas con Zn, en forma de sulfato de Zn o Zn orgánico, obtuvo como resultados un índice de conversión de la alimentación menor con el sulfato de Zn, ya que se pasó de 1,64 a $1,58 \text{ g pienso g}^{-1}$ engorde, no influyendo el Zn orgánico en este parámetro. La ganancia de peso diaria de los pollos aumentó significativamente con el sulfato de Zn, 3 gramos diarios más respecto a la dieta base (Ivanišínová et al., 2016). Sahraei et al. (2013) también obtuvo mayor ganancia de peso en pollos de engorde alimentados con concentraciones de Zn en la dieta que contenía sulfato en comparación con el control o no-Zn.

El mejor tratamiento de Zn considerando la relación rendimiento y concentración de Zn en planta fue el tratamiento Suelo+Foliar, con un rendimiento de $9\ 752,3 \text{ kg ha}^{-1}$ y una concentración de Zn de $86,93 \text{ mg kg}^{-1}$. Cakmak (2008) obtuvo resultados similares en un ensayo en el cual estudió la influencia del Zn en el trigo. El mejor rendimiento lo obtuvo con el tratamiento de Zn solo al suelo, elevándolo un 109% en el rendimiento en biomasa y en un 265% en rendimiento en grano, sin embargo, la concentración de Zn en planta fue de 19 mg kg^{-1} de M.S. en el forraje y de 18 mg kg^{-1} de M.S. en el grano. Siendo la relación más óptima entre rendimiento y concentración de Zn, tanto en el grano como en el forraje del trigo, cuando se aplicaba el Zn al suelo y foliar de forma conjunta, aumentando los rendimientos un 83% y 268% y la concentración de Zn 69 y 35 mg kg^{-1} de M.S. para la parte aérea y el grano, respectivamente.

Respecto a la interacción Se*Zn, no se observa el efecto sinérgico observado para el caso de la concentración de Se. Aunque la mayor concentración de Zn se obtuvo cuando no se aplicó Se pero si Zn foliarmente, la diferencia no fue significativa respecto a la aplicación combinada Suelo+Foliar, con o sin Se y a la aplicación conjunta Se-Zn Foliar (Figura 5.5). Poblaciones y Rengel (2016) estudiaron la biofortificación combinada de Se y Zn en el grano de guisante bajo condiciones controladas en invernadero, la aplicación de Se fue de 1 mL por maceta de spray foliar al 0,03 y 0,06% de SeNaO_4 y la aplicación de Zn fue de 10 ml por maceta de spray foliar $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0,25% y 0,5%; este estudio tanto los parámetros de brote como de raíz no se vieron afectados, es decir, que los tratamientos no influyeron en el rendimiento, pero la concentración de Se fue 17 y 25 veces mayor con los

tratamientos de 0,03 y 0,06 %, respectivamente, mientras que el Zn fue 1,25 y 2,5 veces mayor con los tratamientos de 0,25% y 0,5%, respectivamente. Este hecho, que puede resultar a priori negativo de cara a los agricultores, debe ser tenido en cuenta como que la aplicación combinada Se y Zn es una práctica más que recomendable en estos suelos, deficientes en ambos elementos y por tanto, ávidos de aumentar las concentraciones en las partes comestibles de los cultivos que crecen en ellos.

5.7. Viabilidad económica de los tratamientos: Se foliar y Zn Suelo, Foliar y Suelo+Foliar

En este apartado vamos a llevar a cabo un cálculo de los costes de la biofortificación realizada para cada uno de los tratamientos, con el objetivo de mostrar la viabilidad económica de estos para explotaciones agrícolas y que no supone un gasto para los agricultores, sino un beneficio.

Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de selenato sódico sobre el cultivo de guisante forrajero

En primer lugar, trataremos los costes generados con la aplicación foliar de 10 g Se ha⁻¹, pues ha sido la dosis utilizada en este ensayo y ha mostrado ser la más eficaz en ensayos previos (Poblaciones et al., 2013).

Los costes son los siguientes:

- Precio del producto: el coste de 100 g de selenato sódico aplicado será de 80,59 €, dado que se deberán aplicar 10 g de Na₂SeO₄ ha⁻¹, el coste por ha es de:

$$10 \text{ g Na}_2\text{SeO}_4 \text{ ha}^{-1} * 0,8059 \text{ € g}^{-1} = 8,059 \text{ € ha}^{-1}$$

- Coste de la aplicación: según el método ASAE, consideramos el coste horario de funcionamiento de un tractor más pulverizador 30 € h⁻¹ y el rendimiento de 0,4 h ha⁻¹, la aplicación generará un coste de 12 € ha⁻¹. Al ser solo necesario un único pase para realizar el tratamiento, el coste sería:

$$1 \text{ pase} * 12 \text{ € ha}^{-1} \text{ pase}^{-1} = 12 \text{ € ha}^{-1}$$

- Coste total: al sumar los dos costes anteriores obtenemos el coste total de la aplicación que resulta en 20,059 € ha⁻¹.

Si consideramos como rendimiento medio del guisante forrajero no biofortificado 8 465,2 kg ha⁻¹ y del biofortificado 9 255,7 kg ha⁻¹, que son los obtenidos en este ensayo y que el precio de kg de forraje de guisante es de 0,17 € y el coste de la aplicación de Se 20,059 € ha⁻¹, el beneficio obtenido por el agricultor de la aplicación de Se sería de 114,33 € ha⁻¹ (Tabla 4.10). Además, el precio del guisante biofortificado que hemos considerado, igual al no biofortificado, podría alcanzar en el mercado un precio mayor, debido a los beneficios que presenta en la alimentación del ganado y que hemos indicado en apartados anteriores. También, probablemente el beneficio incrementaría al clasificarse como alimento funcional que es ‘todo alimento que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y que sus efectos positivos justifican que pueda reivindicarse sus características funcionales o incluso saludables’ (International Life Sciences Institute).

TABLA 4.10. Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de Se

| | No-Se | Se |
|-----------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Rendimiento (kg ha⁻¹) | 8465,2 | 9255,7 |
| Precio del forraje (€ kg⁻¹)* | 0,17 | 0,17 |
| Ganancias (€ ha⁻¹) | 1439,08 | 1573,46 |
| Coste de la aplicación (€ ha⁻¹) | 0 | 20,06 |
| Beneficio (€ ha ⁻¹) = Ganancias - Coste | 1439,08 | 1553,41 |
| Diferencia frente al control (€ ha ⁻¹) | | 114,33 |

* Precio algo inferior al de la lonja de León para la alfalfa que, al ser de la misma familia del guisante, presenta características muy similares.

Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de sulfato de Zn sobre el cultivo de guisante forrajero

En este apartado vamos a evaluar la viabilidad económica de los siguientes tratamientos: Zn Suelo, Zn Foliar y Zn Suelo+Foliar.

- Precio del tratamiento al suelo: el coste de la pulverización de la superficie del suelo con una dosis de $50 \text{ kg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O ha}^{-1}$, siendo el precio del fertilizante de $1,35 \text{ € kg}^{-1}$ es de:

$$50 \text{ kg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O ha}^{-1} * 1,35 \text{ € kg}^{-1} = 67,5 \text{ € ha}^{-1}$$

- Precio del tratamiento foliar: el coste de la pulverización foliar con una solución acuosa a una dosis de $8 \text{ kg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O ha}^{-1}$, siendo el precio del fertilizante de $1,35 \text{ € kg}^{-1}$ es de:

$$8 \text{ kg ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O ha}^{-1} * 1,35 \text{ € kg}^{-1} = 10,8 \text{ € ha}^{-1}$$

- Precio del tratamiento al suelo combinado con el tratamiento foliar: es el resultante de la suma de los dos anteriores $67,5 \text{ € ha}^{-1}$ y $10,8 \text{ € ha}^{-1}$, es decir, $72,9 \text{ € ha}^{-1}$.
- Coste de la aplicación: el coste de la maquinaria para llevar a acabo la aplicación sería al igual que en el Se, $12 \text{ € ha}^{-1} \text{ pase}^{-1}$. Cuando el tratamiento es combinado se realizan dos pases y el precio es, por tanto, de 24 € ha^{-1} .
- Coste total: el coste total es el resultado de sumar los dos costes para cada uno de los tratamientos.

$$\text{No-Zn: } 0 \text{ € ha}^{-1}$$

$$\text{Zn Suelo: } 67,5 \text{ € ha}^{-1} + 12 \text{ € ha}^{-1} = 79,5 \text{ € ha}^{-1}$$

$$\text{Zn Foliar: } 10,8 \text{ € ha}^{-1} + 12 \text{ € ha}^{-1} = 22,8 \text{ € ha}^{-1}$$

$$\text{Zn S+F: } 67,5 \text{ € ha}^{-1} + 10,8 \text{ € ha}^{-1} + 24 \text{ € ha}^{-1} = 102,3 \text{ € ha}^{-1}$$

Si consideramos como rendimiento medio del guisante forrajero del tratamiento No-Zn $7\ 969,7 \text{ kg ha}^{-1}$, del Zn Suelo $9\ 967,8 \text{ kg ha}^{-1}$, del Zn Foliar $7\ 752,1 \text{ kg ha}^{-1}$ y del Zn Suelo+Foliar $9\ 752,3 \text{ kg ha}^{-1}$, los cuales son los obtenidos en este ensayo, el precio de kg de forraje de guisante $0,17 \text{ €}$ y el coste de la aplicación de Zn $0, 79,5, 22,8$ y $102,3 \text{ € ha}^{-1}$, respectivamente, en comparación con el guisante no biofortificado, el beneficio obtenido por el agricultor con el tratamiento Zn Suelo sería de $260,17 \text{ € ha}^{-1}$ y con Zn Foliar sería de $200,742 \text{ € ha}^{-1}$, con el tratamiento Zn Foliar perdería $59,79 \text{ € ha}^{-1}$ (Tabla 4.11). En cuanto al tratamiento Zn Foliar, aunque aparentemente el agricultor pierde dinero, hay que tener en cuenta que el precio del guisante biofortificado que hemos considerado es igual al no biofortificado y, sin embargo, podría alcanzar en el mercado un precio mayor por los

beneficios que presenta. Además, como he indicado en el apartado anterior debería ser considerado como alimento funcional, lo cual incrementaría su valor.

TABLA 5.11. Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de Zn

| | No-Zn | Zn Suelo | Zn Foliar | Zn S+F |
|----------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Rendimiento (kg ha⁻¹) | 7969,7 | 9967,8 | 7752,1 | 9752,3 |
| € kg⁻¹ | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,17 |
| Ganancias (€ ha⁻¹) | 1354,85 | 1694,53 | 1317,86 | 1657,89 |
| Coste de la aplicación (€ ha⁻¹) | 0 | 79,5 | 22,8 | 102,3 |
| Beneficio = Ganancias - Coste | 1354,85 | 1615,03 | 1295,06 | 1555,59 |
| Diferencia frente al control (€ ha ⁻¹) | | 260,18 | -59,79 | 200,74 |

Ganancias, costes y beneficio de la aplicación combinada de selenato sódico y sulfato de Zn sobre el cultivo de guisante forrajero

Costes de la aplicación de Se + Zn suelo:

- Coste de tratamiento de Se: 8,059 € ha⁻¹
- Coste de la aplicación de Zn al suelo: 67,5 € ha⁻¹
- Coste de la maquinaria (2 pases): 24 € ha⁻¹
- Coste total: 99,559 € ha⁻¹

Costes de la aplicación de Se y Zn Suelo+ Foliar (en este caso, solo consideramos dos pases de maquinaria, pues el Se y el Zn se pueden aplicar a la vez)

- Coste de tratamiento de Se: 8,059 € ha⁻¹
- Coste de la aplicación de Zn al suelo: 67,5 € ha⁻¹
- Coste de la aplicación de Zn Foliar: 10,8 € ha⁻¹
- Coste de la maquinaria (2 pases): 24 € ha⁻¹
- Coste total: 110,359 € ha⁻¹

TABLA 5.12. Ganancias, costes y beneficio de la aplicación de Se y Zn de forma conjunta

| | No-Se + No-Zn | Se + Zn Suelo | Se + Zn S+F |
|---------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Rendimiento (kg ha⁻¹) | 7659,25 | 10899,7 | 9488,4 |
| € kg⁻¹ | 0,17 | 0,17 | 0,17 |
| Ganancias (€ ha⁻¹) | 1302,07 | 1852,94 | 1613,03 |
| Coste de la aplicación (€ ha⁻¹) | 0 | 99,56 | 110,36 |
| Beneficio = Ganancias - Coste | 1514,24 | 1753,38 | 1502,67 |
| Diferencia frente al control (€ ha⁻¹) | | 239,14 | 11,57 |

En el caso de aplicar Se y Zn al suelo de forma conjunta, se obtuvo un rendimiento de 10899,7 kg ha⁻¹, la concentración de Se fue de 111,16 µg kg⁻¹ y la de Zn 74,42 mg kg⁻¹. En este caso, las ganancias son altas, aunque 20 € menos que el tratamiento Zn Suelo. Sin embargo, este tratamiento lo consideramos mejor por su alta concentración de Se.

En el caso de aplicar el Se y el Zn Suelo+Foliar conjuntamente, únicamente serían necesarios dos pases, uno para la aplicación al suelo y otro para la aplicación foliar. En este caso, el rendimiento medio obtenido fue de 9488,4 kg ha⁻¹, la concentración de Se fue de 256,47 µg kg⁻¹ y la de Zn 83,47 mg kg⁻¹ siendo más alta que el tratamiento Se + Zn Suelo, por lo que en su conjunto sería uno de los mejores tratamientos, en el que el coste de la aplicación ascendería a 110,36 € ha⁻¹ y el beneficio se reduce a 11,57 € ha⁻¹.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A continuación, expongo las conclusiones del presente estudio que se refieren a datos de un solo año agrícola (2017/2018), por lo que se hace absolutamente necesario ampliar los años de estudio para obtener resultados concluyentes y clarificar la biofortificación agronómicas del Se y del Zn en el guisante forrajero (*Pisum sativum* L.) bajo condiciones semiáridas mediterráneas. No obstante, las conclusiones que se han obtenido en este año agrícola fueron las siguientes:

- La alta precipitación durante todo el año agrícola, en general, y la elevada precipitación primaveral, en particular, elevaron los rendimientos de forma significativa.

- El suelo donde se llevo a cabo el ensayo, al igual que muchos otros del suroeste peninsular son deficientes en Se y Zn, por lo que los cultivos que se sitúen en estos terrenos son susceptibles de ser biofortificados con estos nutrientes.

- El rendimiento en biomasa aumentó significativamente un 9,3% debido a la aplicación foliar de Se respecto a la no aplicación y, en los tratamientos con la aplicación al suelo de 50 kg Zn ha⁻¹, tanto de forma aislada como en combinación con el tratamiento foliar, en un 25,1% y un 22,4%, respectivamente.

- El contenido proteico (%) disminuyó con la aplicación foliar de Se de manera significativa, pasando de 17,99 a 17,47% y con la aplicación de Zn al suelo. Sin embargo, aumentó significativamente con la aplicación foliar de Zn. El contenido de cenizas únicamente mostró un menor contenido con la combinación de las aplicaciones foliares de Se y Zn disminuyendo el contenido.

- La fibra neutro detergente (%), la fibra ácido detergente (%) y el contenido en lignina (%) no se vieron influidos por ninguno de los tratamientos.

- El contenido de Ca no mostró diferencias en ninguno de los tratamientos. El Fe disminuyó con la aplicación de Zn vía foliar y con la aplicación combinada al suelo y foliar. El Mg disminuyó en todos los tratamientos con Zn tanto al suelo como foliar.

- La concentración de Se aumentó significativamente, en casi cuatro veces cuando se aplicó 10 g Se ha⁻¹, poniendo de manifiesto que cuando se aplica vía foliar la planta lo

absorbe y acumula eficazmente. La biofortificación combinando las aplicaciones foliares de Se y Zn, tanto de forma aislada como en combinación con el tratamiento foliar provocaron un efecto sinérgico en la acumulación de Se en el forraje de guisante.

- Se comprobó como la concentración de Zn más alta se obtuvo con los tratamientos de Zn Foliar y Zn Suelo+Foliar, mostrando diferencias significativas respecto a la no aplicación de Zn. El efecto de aplicar conjuntamente Se foliar no influyó significativamente sobre la acumulación de Zn en el forraje.

Estudiando por un lado el rendimiento en biomasa y su precio en mercado y el coste de la aplicación de los distintos tratamientos, los tratamientos que resultan ser económicamente rentables son la aplicación de Se, la aplicación de Zn al suelo y la aplicación combinada de Zn al suelo y foliar. Si a eso añadimos el valor añadido por las mayores concentraciones en Se y Zn alcanzadas, destacaríamos la aplicación conjunta de Se y Zn Suelo+Foliar, pues, aunque el beneficio es inferior a la combinación Se con Zn al suelo, la mayor calidad nutritiva justifica la decisión.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C., Hambidge, M., Raboy, V., Dorsch, J.A., Lei Sian, J., Westcott, J., Krebs, F. (2002). Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 556-559.
- Adsule, R.N., K. M. Lawande, S. S. Kadam: Pea. (1989). In *Hand-book of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization*. Salunkhe, D.K. Kadam, S.S. (eds.). CRC Press, Florida. pp: 215–251.
- Alford, É.R., Pilon-Smits, E., Fakra, S. y Paschke, M. (2012). Selenium hyperaccumulation by *Astragalus* (Fabaceae) does not inhibit root nodule symbiosis. *Am. J. of Bot.* 99: 1930 – 1941.
- Alfthan, G., Euroola, M., Ekholm, P., Venäläinen, E.R., Root, T., Korkalainen, K., et al. (2014). Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 31:142-147.
- Alloway, B.J. (2008). Zinc in soils and crop nutrition. International Zn Association. Bruselas y París.
- Alzueta, C y González, G. (1981). Valoración nutritiva del residuo fibroso resultante del fraccionamiento de la planta desgranada de *Pisum sativum*. *Pastos*, 11: 371-381.
- Amarakoon, D., Thavarajah, D., Mcphee, K. y Thavarajah, P. (2012). Iron-, zinc-, and magnesium-rich field peas (*Pisum sativum* L.) with naturally low phytic acid: A potential food-based solution to global micronutrient malnutrition. *J. of F. Comp. and Ana.* 27:8–13.
- Aréchiga, C.F., Vázquez-Flores, S., Ortiz, O., Hernández-Cerón, J., Porras, A., McDowell, L.R., Hansen, P.J. (1998). Effect of injection of β -carotene or vitamin e and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50: 65–76.
- Asher, C.J., Butler, G.W., Peterson, P.J. (1977). Selenium Transport in Root Systems of Tomato. *J. Experim. Bot.* 28: 279-291.

- Ates, E., Coskuntuna, L. y Tekeli, A.S. (2010.) Contenidos de aminoácidos y fibra de cuatro leguminosas forrajeras anuales diferentes en estado de florecimiento completo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44: 73-78.
- Bañuelos G. S., Lin Z.-Q., Yin X. (2013). *Selenium in the Environment and Human Health*. Leiden: CRC Press. Pp:34.
- Barber, S. A. (1995). *Soil nutrient bioavailability*. New York, USA.
- Barrow, N.J., Whelan, B.R. (1989). The effects of pH and of electrolyte on the reaction of selenite and selenate with a soil. *J. Soil Sci.* 40: 17–28.
- Benavides-Mendoza, A., Ramírez, H., Robledo-Torres, V., Olivia Fuentes-Lara, L., Sandoval Rangel, A. (2012). Elementos traza y calidad nutricional, casos del yodo, zinc y selenio. Pp: 139-164.
- Boland, M.P. (2003). Trace minerals in production and reproduction in dairy cows. *Adv. in Dairy Tech.* 15: 319-330.
- Boros, D., Wiśniewska, M., Lahuta, L.B., Kamińska, B. y Boros, L. (2015). Dietary fibre content and profile in peas (*Pisum sativum* L.) produced under sustainable cropping system. Conference: 6th International Dietary Fibre Conference, 1-3, June 2015. *Book of Abstracts*, pp. 145.
- Bouis, H.E., Chassy, B.M. y Ochanda, J.O. (2003). Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. *Trends in Food Sci. and Tech.* 14, 191–209.
- Bouis, H.E., Hotz, C., McClafferty, B., Meenakshi, J.V., Pfeiffer, W.H. (2011). Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr. Bull.* 32: S31-S40.
- Brennan, R. F. (2001). Residual value of zinc fertilizer for production of wheat. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 541–547.
- Broadley, M.R., White, P.J., Bryson, R.J., Meacham, M.C., Bowen, H.J., Johnson, S.E., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., F.J. Zhao, F.J., Breward, N., Harriman, M. y Tucker,

- M. (2006). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceed. Nutr. Soc.* 65:169-181.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. and Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol.* 173: 677-702.
- Brown, K.M. y Arthur, J.R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 4: 593-599.
- Caballero, R. (2001). Typology of cereal-sheep farming systems in Castile-La Mancha (south-central Spain). *Agricultural Systems* 68: 215-232.
- Cabaraux, J.F., Dotreppe, O., Hornick, J.L., Istasse, L. y Dufrasne, I. (2007). Les oligo-éléments dans l'alimentation des ruminants: État des lieux, formes et efficacité des apports avec une attention particulière pour le sélénium. *CRA-W-Fourrages Actualités* 12ème journée. Pp: 28–36.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? *Plant soil*: 302: 1-17.
- Cakmak I, Kalayci M, Kaya Y, Torun AA, Aydin N, Wang Y, et al. (2010). Biofortification and Localization of Zinc in Wheat Grain. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9092–9102.
- Cartes, P., Gianfreda, L. y Mora, M.L. (2005). Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant and Soil*, 276: 359-367.
- Casals Mercadal, G., Torra Santamaria, M., Deulofeu Piquet, R. y Ballesta Gimeno, A.M. (2005). Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química clínica*, 24: 141-148.
- Cesfac. (2008). *Mercados y Estadísticas del año 2007*. Fundación Cesfac, Madrid.
- Chimwamuombe, P.M., Khulbe, R.K. (2011). Domestication. In: Pratap A, Kumar J (Eds.) *Biology and breeding of food legumes* 19–34. CABI, Massachusetts, USA.
- Chrenkova, M., Formelova, Z., Chrastinova, L., Lahucky, R., Flak, P. y Bahelka, I. (2007). Effect of replacement of soybean by peas on performance, carcass characteristics and meat quality of growing finishing pigs. *Proc. of the Soc. of Nutr. Phys.* 16, 108.
- Combs, G.F. (2001). Selenium in global food systems. *Br. J. Nutr.* 85: 517-547.

- Costa de Oliveira, V., Faquin, V., Carvalho Guimarães, K., Ribeiro Andrade, F., Pereira, J., Guimarães Guilherme, L.R. (2018). Agronomic biofortification of carrot with selenium. *Ciência e Agrotecnologia*, 42:138-147.
- Cruz-Jimenez, G. (2005). Toxicity and Accumulation of Selenium by Plant Species from the Chihuahua Desert. Tesis Doctoral. The University of Texas at El Paso. El Paso, Texas, USA. Pp: 50-51.
- Cubero, J.I. (2017). Leguminosas hortícolas: guisantes, judías y habas. En: *Cultivos hortícolas al aire libre. Serie Agricultura. Cajamar Caja Rural*.
- De Candolle, A. (2007). *Origin of cultivated plants*. Kesinger Publishing, Montana, USA.
- Deepalakshmi, A., Ramakrishnaiah, H., Ramachandra, Y.L. y Kumar, N. (2014). Leaves of Higher Plants as Indicators of Heavy Metal Pollution along the Urban Roadways. *Int. J. of Sci. and Tech.* 3.
- Diatta, J. y Kocialkowski, W. (1998). Adsorption of zinc in some selected soils. *Polish J. of Env. Stu.* 7: 195-200.
- Díaz Alarcón, J.P., Navarro Alarcon, M., De la Serrana, H.L.G., Lopez Martínez, M.C. (1994). Determination of selenium levels in vegetables and fruits by hybrid generation atomic-absorption spectrometry. *J Agric Food Chem.* 42: 2848-2851.
- Drahonovský, J., Száková, J., Mestek, O., Tremlová, J., Kaňa, A., Najmanová, J. y Tlustoš, P. (2016). Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Env. and Exp. Bot.* 125: 12-19.
- Eiche, E., Bardelli, F., Nothstein, A.K., Charlet, L., Göttlicher, J., Steininger, R., Dhillon, K.S., y Sadana, U.S. (2015). Selenium distribution and speciation in plant parts of wheat (*Triticum aestivum*) and Indian mustard (*Brassica juncea*) from a seleniferous area of Punjab, India. *Sci. Total Environ.* 505: 952-961.
- El Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N., y Davidian, J. C. (2007). Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant physiol.* 143: 1231-41.

- Elzebroek, T., y Wind, K. (2008). Guide to cultivated plants. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Engle, T.E., Nockels, C.F., Kimberling, C.V., Weaber, D.L. y Johnson, A.B. (1997). Zinc repletion with organic or inorganic forms of zinc and protein turnover in marginally zinc deficient calves. *J Anim. Sci.* 75: 3074-3081.
- FAO (2016) FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Ferguson, E.L., Gibson, R.S., Thompson, L.U., Ounpuu, S. y Berry M. (1988). Phytase, zinc, and colon content of 30 East African foods and their calculated phytate: Zn, Ca: phytate and [Ca] [phytate]/[Zn] molar ratios. *J Food Comp Anal.* 1: 316- 25.
- Fernandes Boldrín, P., Faquin, V., Júnio Ramos, S., Furtini Boldrin, K.V., William Ávila, F. y GuimarãesGuilherme, L.R. (2013). Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. of F. Comp. and Anals.* 31: 238-244.
- Fordyce, F. (2005). Selenium deficiency and toxicity in the environment. *Essentials of Medical Geology.* Pp. 373–415.
- Freeman, J.L., Marcus, M.A., Fakra, S.C., Devonshire, J., McGrath, S.P., Quinn, C.F., et al. (2012). Selenium Hyperaccumulator Plants *Stanleya pinnata* and *Astragalus bisulcatus* are colonized by Se-resistant, Se-excluding wasp and beetle seed herbivores. *PLoS ONE*, 7: e50516.
- Frossard, E., Bucher, M., Mächler, F., Mozafar, A. y Hurrell, R. (2000). Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J. of the Sci. of Food and Agr.* 80: 861-879.
- Garau, A., Filippini de delfino, S. y Berrondo, G. (2000). Influencia de factores climáticos en las fechas de inicio de floración y brotación de clones de álamo en el delta del paraná, argentina. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* Vol. 9.
- García, D. E., Medina, M. G., Moratinos, P., Cova, L. J., Torres, A., Santos, O. y Perdomo, D. (2009). Caracterización químico-nutricional de forrajes leguminosos y de otras familias botánicas empleando análisis descriptivo y multivariado. *Revista de investigación y difusión científica agropecuari*, 13: 25 – 39.

- Garrido Valero, M.S. (1993). Interpretacion de analisis de suelos. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Hojas divulgativas: 5.
- Germ M., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K., Stibilj V., Jaćimović R. y Kreft, I. (2013). Impact of double Zn and Se biofortification of wheat plants on the element concentrations in the grain. *Plant, Soil and Env.* 59, 316–321.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Momeni, M. y Bahmani, M. (2013). Ethnobotanical study of medicinal plants. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 10: 368-386.
- Gomez-Coronado F, Poblaciones MJ, Almeida A, Cakmak, I. (2016). Zinc (Zn) concentration of bread wheat grown under Mediterranean conditions as affected by genotype and soil/foiar Zn application. *Plant Soil*, 401: 331-346.
- González Mateos, G., Pérez Serrano, M., Frikha, M., Lázaro García, R. y García Valencia, D. (2014). Composición nutricional del guisante. Departamento de Producción Animal, Universidad Politécnica de Madrid.
- Graham, R.D., Welch, R.M. y Bouis, H.E. (2001). Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives and knowledge gaps. *Adv. in Agron.* 70: 77–142
- Graham RD, Welch RM, Saunders, DA, Ortiz-Monasterio I, Bouis HE, Bonierbale M, et al. (2007). Nutritious subsistence food systems. *Adv. Agron.* 92: 1-74.
- Grasso, P., Scholz, R., Erskine, R., Eberhart, R. (1990). Phagocytosis bactericidal activity and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium supplemented and selenium deficient rats. *Am. J. Vet. Res.* 51: 269-74.
- Guerrero, B., Llugany, M., Palacios, O. y Valiente, M. (2014). Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Phys. and Bioch.* 83: 300- 307.
- Hajiboland, R. y Amjad, L. 2007. Does antioxidant capacity of leaves play a role in growth response to selenium at different sulfur nutritional status? *Plant Soil Environt*, 53: 207-215.

- Hall, J.A., Van Saun, R.J., Nichols, T., Mosher, W. y Pirelli, G. (2009). Comparison of Se status in sheep after short-term exposure to high-Se-fertilized forage or mineral supplement. *Small Ruminant Res.* 82: 40–45
- Hall, J.A., Harwell, A.M., Van Saun, R.J., Vorachek, W.R. y Stewart, W.C. 2011. Agronomic biofortification with selenium: Effects on whole blood selenium and humoral immunity in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164: 184–190.
- Hambidge, M. (2000). Human zinc deficiency. *J Nutr.* 130:1344S-9S.
- Han, D., Li, X., Xiong, S., Tu, S., Cen, Z, Li, J. y Xie, Z. (2013). Selenium uptake, speciation and stressed response of *Nicotiana tabacum* L. *Env. and Exp. Bot.* 95: 6-14.
- Hawkesford, M.J. y Zhao, F.J. (2007). Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J Cereal Sci.* 46: 282-292.
- Hotz, C y Brown, K.H. (2004) Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food and Nutr. Bulletin*, 25: S91-S204.
- Howieson, J.G., O'hara, G.W. y Carr, S.J. (2000). Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Field Crops Research* 65: 107-122.
- Hubbard, D. (2007). Essential and Non essential Amino Acids. En: Ates, E., Coskuntuna, L. y Tekeli, A.S. 2010. Contenidos de aminoácidos y fibra de cuatro leguminosas forrajeras anuales diferentes en estado de florecimiento completo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44: 73-78.
- Ivanišinová, O, Grešáková, L, Ryzner, M, Ocel'ová, V y Čobanová, K. (2016). Effects of feed supplementation with various zinc sources on mineral concentration and selected antioxidant indices in tissues and plasma of broiler chickens. *ACTA VET. BRNO* 2016, 85: 285-291.
- Klaus-Helge, L. y Rink L. (2003). Zinc-Altered Immune Function. *J. Nutr.* 133: 1452S–1456S.

- Kochian, L. V. (1993). Zinc absorption from hydroponic solution by plant roots. Chap 4 in Robson, A.D. (eds.) Zinc in Soils and Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp 45-58.
- Lafarga, A., Goñi Rípodas, J. Y Lezáun, J. (2003). Guisante proteaginoso en Navarra. Instituto Técnico y de Gestión Agrícola de Navarra.
- Lyons, G., Stangoulis, J. y Graham, R. (2003). High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutr. Res. Reviews*, 16: 45–60.
- López-Bellido FJ, Poblaciones MJ, Rodrigo S, López-Bellido L, Zhao FJ (2011) First report of low selenium concentrations in soil and bread-making wheat grain in Guadalquivir Valley (southern Spain). *Trace Elements and Health*, 1: 221–222.
- Malagoli, M., Schiavon, M., Dall'acqua, S. y Pilon-Smiths, E. (2015). Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality *Front Plant Sci.* 6: 280.
- Malakouti, M.J. (2007). Zinc is a neglected element in the life cycle of plants. *Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology*. 1:1-12.
- MAPAMA (2017). <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/default.aspx>
- Marschner, H. (2002). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition, Academic press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.
- Mayland, H.F., James, L.F., Panter, K.E. y Sonderegger, J.L. (1989). Selenium in seleniferous environments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 23: 15-50.
- Mayland HF (1994) Selenium in Plant and Animal Nutrition. In *Selenium in the Environment*. WT Frankerberger Jr and S Benson editors. Pp: 29-45.
- Mehdi, Y., Hornick, J., Istasse, L., y Dufrasne, I. (2013). Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules*, 18: 3292-3311.

- Moreno Rodríguez, M.J., Cala Rivero, V. y Jiménez Ballesta. (2005). Selenium Distribution in Topsoils and Plants of a Semi-arid Mediterranean Environment. *Env. Geoch. and Health*, 27: 513-519.
- Moreno et al., 1976. En Alzueta, C y González, G. (1981). Valoración nutritiva del residuo fibroso resultante del fraccionamiento de la planta desgranada de *Pisum sativum*. *Pastos*, 11: 371-381.
- Mortimer, R.G., Dargatz, D.A., & Corah, L.R. (1999). Forage Analyses from Cow-Calf Herds in 23 States. USDAAPHIS:VS, Centers for Epidemiology and Animal Health. Fort Collins, CO. #N303.499. April 1999
- Mourinho, M., Pelica, J., Pataco, I.M. y Ramalho, J. (2015). Zinc biofortification in *Triticum aestivum* L. From grains to bakery products. *Emirates J. of F. and Agr.* 27: 164-170.
- Mufarrege, D.J. (1999) Los minerales en la alimentación de vacunos de carne en la Argentina. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes. Trabajo de Divulgación Técnica.
- National Research Council. (2000). 'Reference intakes for vitamin A, vitamin K, As, B, Cr, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Ni, Si and Zn.' (Ed. Institute of Medicine/ Food and Nutrition Board) pp. 37-46. (National Academy Press: Washington, DC)
- NRC- National Research Council. Nutrient Requirements of Beef Cattle. (2000). National Academy Press, Washington, DC. (USA). Minerals. Pp: 54-74.
- Oldfield, J.E. (1999). Selenium World Atlas. Selenium-Tellurium Development Association, Grimbergen, Belgium. Pp. 83.
- Oliver, M., Pardo, G., Perea, F. y Urbano, J.M. (2006). Estudio de competencia de malas hierbas en cultivo de guisante proteaginoso en segundo año de agricultura ecológica. Zaragoza, VIII Congreso SEAE.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients.
- Otal, J., Quiles, A. y Orengo, J. (2009). Producción de materia seca y calidad forrajera de leguminosas anuales de clima mediterráneo. *An. Vet.* 25: 111-122.

- Pala, M., Ryan J., Zhang, H., Singh, M. y Harris, H.C. (2007). Water-use efficiency of wheat-based rotation systems in a Mediterranean environment. *Agricultural water management* 93: 136-144
- Pavek, P.L.S. y McGee, R. (2016). *Plant Guide for lentil (Lens culinaris Medik.)*. USDA-Natural Resources Conservation Service, Pullman Plant Materials Center. Pullman, WA.
- Perea Torres, F. y otros. (2015). *Guía del Cultivo de Guisantes Proteaginosos*. Junta de Andalucía.
- Petterson, D.F., Harris, D.J., Rayner, C.J., Blakeney, A.B. y Choct, M. (1999). Methods for the analysis of premium livestock grains. *Australian J Agric Res.* 50: 775-87.
- Pfeiffer, W.H. y McClafferty, B. (2007). HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop. Sci.* 47: S88–S105.
- Pilon-Smits, E., Zhao, F.J., Zhu, Y.G., Williams, P.N. y Meharg, A.A. (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanism for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci.*, 14: 436–42.
- Poblaciones M.J., Rodrigo, S. y Santamaria, O. (2013). Evaluation of the potential of peas (*Pisum sativum* L.) to be used in selenium biofortification programs under Mediterranean conditions. *Biological Trace Element Res.* 151: 132-137.
- Poblaciones, M.J. y Rengel, Z. (2016). Combined foliar selenium and zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Crop & Pasture Sci.* 68: 265-271.
- Poblaciones, M.J. y Rengel, Z. (2017). Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chem.* 212: 427 - 433.
- Poblaciones, M.J. y Rengel, Z. (2018). The effect of processing on *Pisum sativum* L. biofortified with sodium Selenate. *Food Chem. J. Plant Nutr. Soil Sci.* 000: 1-6.
- Provedo Pisano, R. y Caminero Saldaña, C. (2007). *Red de ensayos de nuevas variedades de leguminosas en Castilla y León*. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

- Puls, R. (1988). *Mineral Levels in Animal Health. Diagnostic Data.* Sherpa International, Clearbrook, BC.
- Ramos, A.E., Cseh, S.B. y Paolicchi, F. (2008). Efecto de la suplementación con selenio sobre la presencia de mastitis en vacas lecheras. *Revista argentina de producción animal.* 28: 217-225
- Ramos, S.J., Rutzke, M.A., Hayes, R.J., Faquin, V., Guilherme, L.R. y Li, L. (2011). Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta*, 233:649-660.
- Rasbi, R, Berger, A, Bauer, D, y Brink, D. (2011). Mineral and vitamins for beef cows. *Mineral Interactions and Supplementation for Beef Cows.*
- Ravindran, V., Ravindran, G. y Sivalogan, S. (1994). Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem.* 50: 133-36.
- Rayman, M.P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proc. of the Nutr. Soc.* 61, 203–215.
- Rayman, M.P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *British J. of Nutr.* 92: 557–573.
- Rayman MP (2012). Selenium and human health. *The Lancet.* 379: 1256-1268.
- Riehl, S., Zeidi, M. y Conard, N.J. (2013). Emergence of agriculture in the foothills of the Zagros mountains of Iran. *Sci.* 341: 65-67.
- Ríos, J.J., Rosales, M.A., Blasco, B., Cervilla, L.M., Romero, L. y Ruiz, J.M. (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Sci. Hort.* 116: 248-255.
- Rivadeneira, I.M., Benítez, J.A., Vela, D. y Ponce, C.H. (2015). Efecto de la fuente de suplementación de Selenio (Se) en parámetros productivos e incidencia de mastitis de vacas lecheras multíparas. Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolqui, Ecuador.

- Rotruck, J.T., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. y Hoekstra, W.G. (1972). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Sci.* 179: 588-590.
- Rubio, C., González Weller, D., Martín-Izquierdo, R.E., C. Revert, C., Rodríguez, I. y Hardisson, A. (2007). El zinc: oligoelemento esencial. *Nutr. Hosp.*, 22: 101-107.
- Ryan, J., Ibriki, H., Singh, M., Matar, A., Masri, S., Rashid, A. y Pala, M. (2008). Response to residual and currently applied phosphorus in dryland cereal/legume rotations in three Syrian Mediterranean agroecosystems. *Europ. J. Agronomy* 28: 126-137.
- Saha, U, Fayiga, A, Hancock, D y Sonon, L. (2016). Selenium in Animal Nutrition: Deficiencies in Soils and Forages, Requirements, Supplementation and Toxicity, 2: 112-125.
- Saha, U., Fayiga, A. y Sonon, L. (2017). Selenium in the Soil-Plant Environment: A Review. *Int. J. of App. Agr. Sci.* 3: 1-18.
- Sahraei, M., Janmmohamdi, H., Taghizadeh, A., Ali Moghadam, G. and Abbas Rafat, S. (2013). Estimation of the relative bioavailability of several zinc sources for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *The Journal of Poultry Science*, 50: 53-59.
- Sanskriti, K. 2014. Biofortification of Food Crops with Zinc to Tackle Zinc Malnutrition in Human Population. *Agriculture: Towards a New Paradigm of Sustainability*, pp. 94-98.
- Schiavon M., Dall'acqua S., Mietto A., Pilon-Smits E. A., Sambo P., Masi A., et al. (2013). Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *J. Agric. Food Chem.* 61: 10542–10554.
- Sharma, S., Goyal, R., & Sadana, U.S. (2014). Selenium Accumulation and Antioxidant Status of Rice Plants Grown on Seleniferous Soil from Northwestern India. *Rice Sci.* 21: 327-334.
- Shukla, A, Tiwari, P, Pakhare, A y Prakash, C. (2016). Zinc and Iron in Soil, Plant, Animal and Human Health. *Indian Journal of Fertilisers*, Vol. 12 (11), pp.133-149

- SIAR (Sistema de información agroclimática para el regadio). (2018). <http://portal.mapama.gob.es/websiar/Inicio.aspx>
- Sims, J.T. and Johnson, G.V. (1991). Micronutrient soil tests. En: Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M. y Welch, R.M. (eds.). *Micronutrients in Agriculture: Second Edition*. Soil Science Society of America Book Series. Capítulo 12. pp. 427-476. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Socha, M., Tomlinson, D.J., Johnson, A.B. y Schugel, L.M. (2002). Improved claws through improved micronutrient nutrition. 12th International Symposium on Lameness in Ruminants. Pp: 62-69.
- Stroud, J.L., Li, H.F., Lopez-Bellido, F.J., Broadley, M.R., Foot, I., Fairweather-Tait, S.J., Hart, D.J., Hurst, R., Knott, P., Mowat, H., Norman, K., Scott, P., Tucker, M., White, P.J., McGrath, S.P. y Zhao, F.J. (2010). Impact of sulphur fertilisation on crop response to selenium fertilisation. *Plant Soil*, 332:31–40.
- Sugiura, S. H., Raboy, V., Young, K.A., Dong, F.M. y Hardy, R.W. (1999). Availability of phosphorus and trace-elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 170: 285-96.
- Sura-de Jong, M., Reynolds, R. J. B., Richterova, K., Musilova, L., Staicu, L. C., Chocholata, I. y Pilon-Smits, E. (2015). Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties. *Frontiers Plant Sci.* 6: 113.
- Suttle, N.F. (2010). *Mineral Nutrition of Livestock*. (eds.). MPG Books Group: London, UK, 2010, p. 565.
- Tan, J. (1989). *The Atlas of Endemic Diseases and their Environments in the People's Republic of China*. Science Press, Beijing.
- Tapiero H. y Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* 57: 399-411.
- Tekeli, A.S. y Ates, E. (2006). Valores nutritivos de diferentes tréboles anuales (*Trifolium* sp.) en diferentes etapas de crecimiento. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 40: 97.

- Terry, N., Zayed, A., De Souza, M. y Tarun, A. (2000). Selenium in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biol.* 51: 401–432.
- Thavarajah, D., Warkentin, T. y Vandenberg. (2010). Natural enrichment of Selenium in Saskatchewan field peas (*Pisum sativum* L.). *Can J Plant Sci.* 90: 383-389.
- Tosh, S.M., Farnworth, E.R., Brummer, Y., Duncan, A.M., Wright, A., Boye, J., Marcotte, M. y Benali, M. (2013). Nutritional Profile and Carbohydrate Characterization of Spray-Dried Lentil, Pea and Chickpea Ingredients. *Foods*, 2: 338-349.
- USDA. (1999). *Soil Quality Test Kit Guide*. Washington, DC, USA, National Academy Press.
- Vargas, E. y Lobo, M. (1992). Fósforo fítico en materias primas de origen vegetal usadas en la alimentación animal en Costa Rica. *Agronomía Costarricense.* 16: 139-142.
- Vidart, D. (1996). Contenido mineral de Recursos Forrajeros de Zonas Templadas. Estudio Ledesma Arocena y Asociados. San Isidro (B.A.).
- Wakim, R., Bashour, I., Nimah, M., Sidahmed, M. y Toufeili, I. (2010). Selenium levels in Lebanese environment. *Journal of Geochemical Exploration.* 107: 94-99.
- Wang, S., Liang, D., Wang, D., Wei, W., Fu, D., & Lin, Z. (2012). Selenium fractionation and speciation in agriculture soils and accumulation in corn (*Zea mays* L.) under field conditions in Shaanxi Province, China. *Sci. Total Environ.* Pp: 427-428.
- Warkentin, T. D., Smykal, P., Coyne, C. J., Weeden, N., Domoney, C. y Bing, D. (2015). “Pea (*Pisum sativum* L.)” in *Grain Legumes, Series Handbook of Plant Breeding*. New York, Springer Science+Business Media. Pp: 37–83
- White, P.J. y Broadley, M.R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends of Plant Sci.* 10: 586-593.
- White P.J. y Broadley M.R. (2008). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets -iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New phytologist* 182: 49-84.

- Zayed, A., Lytle, C. M. y Terry, N. (1998). Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*, 206: 284–292.
- Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Kornaś, A., Miszalski, Z., Hartikainen, H.. (2010). Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. *Plant and Soil*, 329: 457-468.
- Zhao, A. Q., Tian, X. H., Cao, Y. X., Lu, X. C., y Liu, T. (2013). Comparison of soil and foliar zinc application for enhancing grain zinc content of wheat when grown on potentially zinc-deficient calcareous soils. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 94, 2016–2022.
- Zohary, D. y Hopf, M. (2000). *Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.

