Caracterización de cultivares de *Trifolium subterraneum* L., mediante espectroscopía de la reflectancia en el infrarrojo cercano

MERCEDES RICO RODRÍGUEZ, BALBINO GARCÍA CRIADO Y ANTONIA GARCÍA CIUDAD

Centro de Edafología y Biología Aplicada de Salamanca (C.S.I.C.)

RESUMEN *

Se intenta la caracterización de distintos cultivares de Trifolium subterraneum *L., mediante espectroscopia de la reflectancia en el infrarrojo cercano (N.I.R.S.). Para ello, se parte de 61 cultivares de trébol subterráneo, de distinta procedencia, naturalizados en Australia y cultivados en la provincia de Salamanca (España).*

Los resultados obtenidos indican que los valores de las seis reflectancias consideradas presentan distribuciones normales, aunque se aprecian algunas variaciones particulares.

La aplicación del análisis de correspondencias a la matriz de datos de reflectancias (log 1/R), permite obtener una ordenación de los cultivares en el plano principal que, de acuerdo con su origen, destaca la agrupación más precisa de los procedentes de Salamanca, Badajoz y Túnez, principalmente. Por otro lado, considerando distintos intervalos de los contenidos de proteína, hemicelulosa y lignina en los cultivares, las reflectancias que más se relacionan

* PALABRAS CLAVE: Trébol subterráneo, *Trifolium suterraneum* L., cultivares, carcaterización, espectroscopía de la reflectancia en el infrarrojo cercano.

con proteína son R_4, R_5, R_3 y R_1, en el sentido de mayor a menor contenido en esta fracción. En cuanto a hemicelulosa, destacan R_3, R_4 y R_5, siguiendo en orden de importancia R_1 y R_4, mientras que para lignina intervienen las seis reflectancias.

Cada uno de los cultivares se caracteriza por un valor ($\Sigma R_i'$) obtenido como sumatorio de las diferencias entre las reflectancias de medición directa y las correspondientes al disco cerámico.

INTRODUCCIÓN

La especie *Trifolium subterraneum* L. es, según algunos autores (MUSLERA y RATERA, 1984), la leguminosa pratense anual de mayor utilización en el mundo y, por supuesto, también en España, donde aparece espontáneamente en los pastizales de los suelos silíceos del cuadrante suroeste peninsular. El conocimiento de sus ventajas agronómicas, particularmente como mejoradora de pastos, ha dado lugar a la selección de nuevos cultivares y ecotipos, adaptados a necesidades y situaciones específicas.

Así en la actualidad existen 19 variedades registradas en Australia, mientras que en otros países, como España, Portugal o Israel, se están llevando a cabo diferentes programas de selección, lo que ha motivado la existencia de un elevado número de cultivares y ecotipos, cuya caracterización individual, tanto desde el punto de vista botánico como químico, es a veces difícil de establecer con precisión.

Por estos motivos, en el presente trabajo, se intenta por primera vez la caracterización de cultivares de trébol subterráneo mediante espectroscopía de la reflactancia en el infrarrojo cercano (N.I.R.S.).

Existen algunos antecedentes referidos a la aplicación de esta técnica en la evaluación de forrajes, de los que a título de ejemplo podemos citar, entre los más recientes, los estudios de COWE (1980), BARNES (1981), BARTON y COLEMAN (1981), TEMPLETON y col. (1981), JENSEN (1983), etc. También cabe mencionar los de RICO y col. (1983) y STARK (1983), encaminados a la diferenciación de especies herbáceas mediante la introducción de valores de reflectancia en el análisis multivariante. Relacionados igualmente con el objetivo de este trabajo, se encuentran el de BARTELS (1983), referido a la identificación y cuantificación

de compuestos químicos por espectroscopía, y el realizado por GARCÍA CIUDAD y col. (1983), respecto a la evaluación automática de especies herbáceas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se parte de un total de 61 cultivares de trébol subterráneo, naturalizados en Australia y con distinta procedencia: 7 son ecotipos autóctonos de la provincia de Salamanca, 9 procedentes de Badajoz, 14 de Turquía, 6 de Túnez, 6 de Marruecos y los 19 restantes son de origen australiano (Tabla I).

Las semillas de dichos cultivares, facilitadas amablemente por C. M. FRANCIS (W.A.D.A. South Perth, Australia), se ensayaron en la finca experimental de Muñovela del C.E.B.A. de Salamanca durante dos años consecutivos. A mediados de mayo de 1982 se tomaron las muestras correspondientes al segundo año, en la fase de formación de frutos, a 3-4 cm del suelo, mediante un cuadrado de 0.5 m de lado y efectuando tres repeticiones por parcela.

Los datos referentes a los factores edafoclimáticos de la zona de experimentación, así como distintos aspectos del ensayo (parcelas experimentales, fertilización, siembra, etc.), fueron expuestos por GARCÍA CIUDAD y col. (1984).

La biomasa vegetal, una vez seca (80° C), se trituró en un micromolino con tamiz de luz de malla de 1 mm y se homogeneizó. Las muestras así preparadas se analizaron en un sistema automático INFRA-ALYZER, Technicon, mod. 2.5 A que trabaja por reflactancia en el infrarrojo cercano a seis longitudes de onda fijas entre 1680 y 2310 nm. La lectura directa de cada muestra, en la forma de log 1/R, permite obtener una matriz de datos de reflectancias a los que denominaremos R_i. Además se elaboró una nueva matriz de datos transformados (R_i'), diferencias entre los valores de medida directa del sistema (R_i) y los correspondientes al disco cerámico para cada reflactancia y muestra; el valor de reflectancia del disco cerámico puede considerarse como nivel de referencia en el ajuste del sistema. De este modo, se obtienen valores con signo positivo o negativo, lo que dificulta su introducción en el análisis multifactorial (GIL, 1978). Para evitar este inconveniente, el tratamiento estadístico de la información se llevó a cabo sobre la matriz de datos de reflectancias (R_i), obtenidas directamente en la medición de cada mues-

TABLA I

CULTIVARES Y ECOTIPOS ENSAYADOS *

AUSTRALIA	BADAJOZ	TURQUIA	TUNEZ
1 Nungarin	22 CFS 3.76	34 69976	58 65188 A
2 Northam A	26 CC 4.4	35 69988	59 65188 B
4 Northam C	27 CFS 1/76	36 70094 B	60 65188 E
5 Bellevue	28 FP-1 Gaitan	37 70100	61 65188 C
6 Mount Helena A	29 FP-3 Gaitan	38 69981	63 65195 C
7 Gingin	30 Gaitan 4	39 69972	64 65195 A
8 Can 434 A	31 Gaitan 17.3	40 70124 B	MARRUECOS
9 Seaton Park	32 Gaitan 18.6	41 70058 A	65 65311
10 Marradong	33 Gaitan 3	42 69970 A	67 65316 A
11 Daliak	SALAMANCA	43 69973 A	68 65316 B
12 Dinninup	50 CC 34.1	44 70088 B	70 65318 A
13 Spencers Brook	51 CC 34.2	45 Trikkala	72 65320
14 Midland B	52 CC 34.3	46 Yarloop	73 65321 B
15 Woogenellup	53 CC 35.1	48 39315 YB	
16 Mulwala	54 CC 35.2		
17 Baulkamaugh	55 CC 38.2 B		
18 Dalkeith	56 CC 33.2 A		
19 Midland A			
20 Clare			

* Procedentes de una colección Australiana (C. M. FRANCIS).

tra, mediante la aplicación de la técnica factorial de correspondencias (BENZECRI, 1970; GIL, 1978).

La proteína bruta se estimó determinando el nitrógeno por el método Kjeldahl, y hemicelulosa y lignina siguiendo el procedimiento de GOERING y VAN SOEST (1970).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se representa la distribución de frecuencias de seis reflectancias observadas sobre las 61 muestras de los cultivares considerados. En general, las distribuciones son de tipo normal, aunque se observan algunas alteraciones particulares.

La reflectancia R_1 (emitida a una longitud de onda λ = 2310 nm) toma valores comprendidos entre 794 y 932, El 75 % de los cultivares se encuentran incluidos en el intervalo de reflectancia de 833 a 913. Con valores bajos (inferiores a 813) destacan los cultivares australianos *cv. Can 434 A* (n.° 8), *cv. Daliak* (n.° 11), *cv. Spencers Brook* (n.° 13), *cv. Dalkeith* (n.° 18), *cv. Midland A* (n.° 19) y el procedente de Turquía *cv. 69988* (n° 33). En el otro extremo, con valores de R_1 superiores a 913, destacan *cv. CC 34.3* (n.° 52) y *cv. CC 35.2* (n.° 54), autóctonos de la provincia de Salamanca; *cv. 70124 B* originario de Turquía, y *cv. 65188 E* procedente de Túnez.

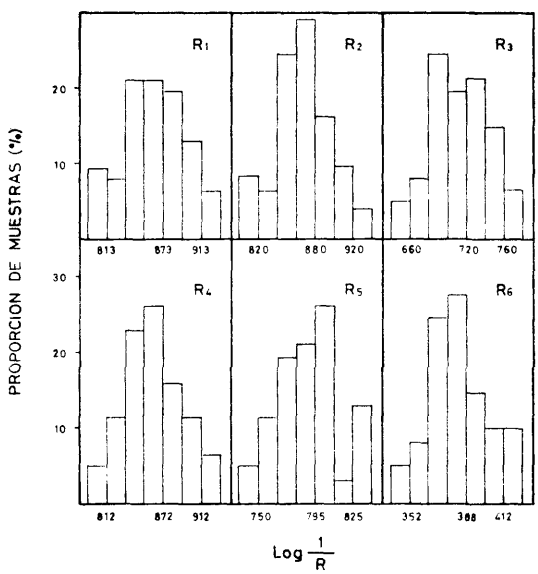

Fig. 1.—Distribución de frecuencias de reflectancia (en seis longitudes de onda) de 61 cultivares de trébol subterráneo.

En cuanto a R_2 (λ = 2230 nm) los valores observados oscilan desde 800 hasta 926, encontrándose el 60 % de los cultivares incluidos en el intervalo 840 a 900. En posiciones extremas, además de los antes mencionados que vuelven a destacar respecto a R_2, cabe citar, con valores inferiores a 840 a los cultivares australianos *cv. Nungarin* (n.º 1) y *cv. Bellevue* (n.º 5), y al procedente de Turquía *cv. 70088 B* (n.º 44). Con valores de R_2 superiores a 900, se encuentran *cv. Gingin* (n.º 7), procedente de Australia; *cv. CC 4.4* (n.º 26), originario de Badajoz; *cv. CC 34.2* (n.º 51) de Salamanca; *cv. 69976* (n.º 34) de Turquía; y *cv. 65316 A* (n.º 67) de Marruecos.

Para R_3 (λ =nm) los valores fluctúan desde 642 a 773; y el 80 % de las muestras consideradas oscilan entre 680 y 760. El 20 % restante está constituido por cultivares mencionados con anterioridad (n.º 8, 11, 35, 1, 5, 13, 18, 19, 52, 54, 40 y 60). Respecto a R_4 (λ = 2100 nm) (valores entre 792 y 921) la mayor densidad de muestras se encuentra en el intervalo 832-892, presentando valores extremos nuevamente los cultivares ya citados. Sin embargo, en cuanto a R_5 (λ = 1940 nm.) la variabilidad es menor que en los casos anteriores (739-834), y las muestras se incluyen preferentemente (67.2 %) en el intervalo 765-810.

Por último, para R_6 (λ = 1680 nm) la oscilación es aún menor (341-424), tomando el 67.21 % de las muestras valores comprendidos entre 364 y 400. Además de los cultivares ya mencionados, podemos resaltar, por sus elevados valores para dicha reflectancia a *cv. 65188 B* (n.º 59), *cv. 65188 C* (n.º 61) y *cv. 65195 A* (n.º 64), todos ellos procedentes de Túnez.

En la figura 2 se representa la ordenación obtenida en el plano definido por los ejes I y II (62.30 % y 21.98 % de absorción de la varianza, respectivamente) del análisis de correspondencias. Las seis reflectancias consideradas se distribuyen a lo largo del eje I, desde su parte negativa, donde destaca en primer lugar R_6 y a continuación R_3 y R_1, hasta la positiva, situándose R_5 en su parte más extrema, mientras R_2 y R_4 ocupan posiciones intermedias. El segundo eje extraido, destaca hacia su parte positiva a R_6, principalmente, y a R_4, contrapuestas a R_1 y R_2, que adquieren coordenadas negativas respecto a dicho componente.

La distribución de los 61 cultivares en el plano principal, se representa, en primer lugar, de acuerdo con su lugar de origen (parte superior izquierda de la figura 2).

Cabe destacar la agrupación de los cultivares Salmantinos en el tercer cuadrante, de los que sobresale *cv. CC 33.2 A* (n.º 56)

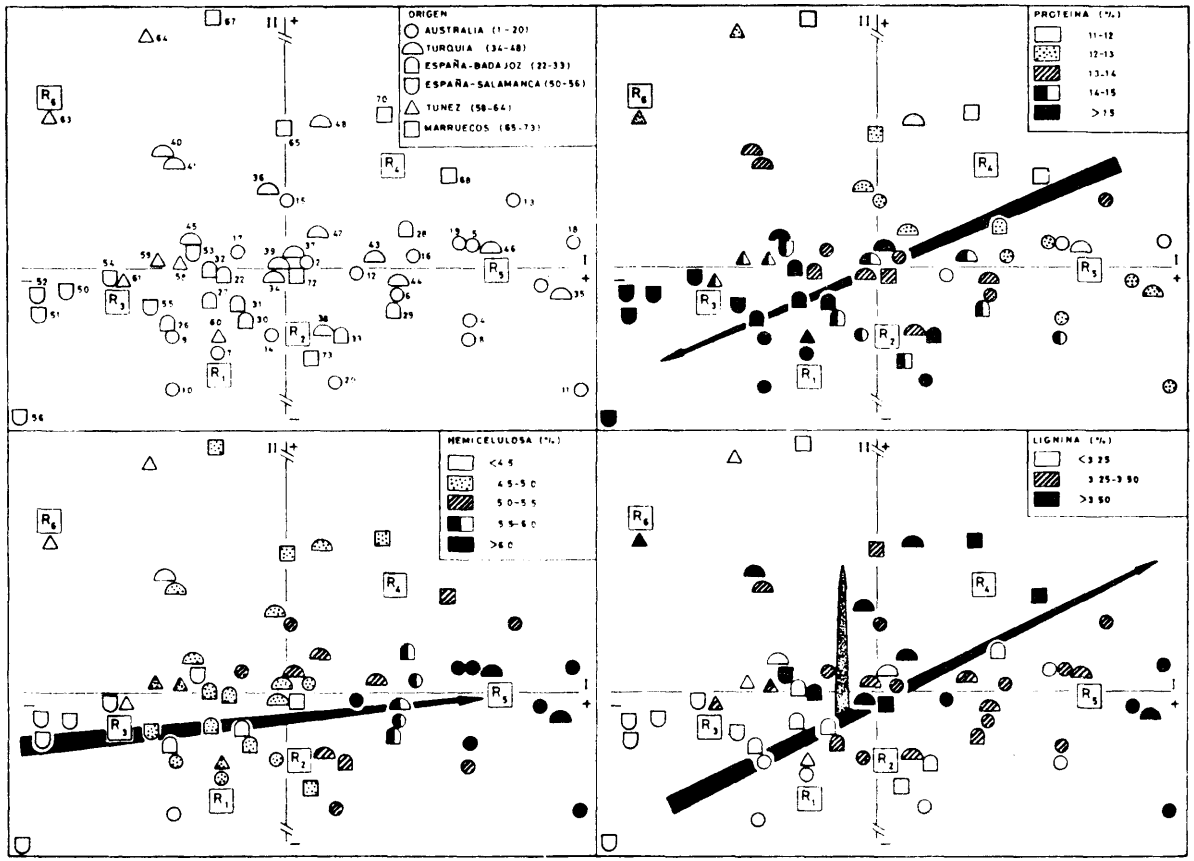

Fig. 2.—Ordenación de los cultivares de acuerdo con su origen y distintos niveles de proteína, hemicelulosa y lignina.

con un elevado contenido en proteína (19.36 %). Los procedentes de Túnez también muestran una distribución bastante definida, en el segundo y tercer cuadrante, destacando *cv. 65195 A* (n.º 64) y *cv. 65195 C* (n.º 63), este último más lignificado que los restantes del grupo. Los procedentes de Badajoz, tienden a localizarse en el tercer cuadrante. Son excepciones *cv. FP-1 Gaitan* (n.º 28), *cv. FP-3 Gaitan* (n.º 29) y *cv. Gaitan* 3 (n.º 33).

Los restantes cultivares muestran distribuciones algo más dispersas, a pesar de ello, cabe señalar la localización de los de Turquía, preferentemente a lo largo de la diagonal del segundo al cuarto cuadrante, la tendencia de los procedentes de Marruecos a tomar coordenadas positivas respecto al primer eje y la distribución de los Australianos a lo largo de este primer componente, preferentemente también en su parte positiva.

Por otra parte, se han considerado distintos niveles de las fracciones proteína, hemicelulosa y lignina, cuyo interés en la diferenciación de los cultivares se ha puesto de manifiesto en estudios previos (García Criado y col. 1985). De esta forma, aparte de ofrecer datos complementarios acerca de las muestras consideradas, se pretende relacionar los valores de reflectancia con los contenidos en dichas fracciones.

Así, en cuanto a proteína (parte superior derecha de la figura 2) las muestras toman una distribución muy precisa, desde el primer al tercer cuadrante a medida que se elevan los porcentajes en dicha variable. Según esto y considerando la posición que ocupan las reflectancias respecto de los ejes, se puede afirmar que las más relacionadas con la proteína (en el sentido antes indicado) son por un lado, R_4 y R_5, y por otro, R_3 y R_1, y posiblemente también R_2, aunque ésta ocupa una posición intermedia.

En cuanto a hemicelulosa (parte inferior izquierda de la figura 2) los cultivares se distribuyen a lo largo del primer eje, desde su parte negativa a la positiva según se incrementa su contenido en dicha fracción. En cuanto a las reflectancias puede observarse que las más relacionadas con los niveles de hemicelulosa en el sentido indicado en la figura son R_3, R_2 y R_5, siguiendo en orden de importancia R_1 y R_4.

La distribución de los cultivares en relación con su grado de lignificación (parte inferior derecha de la figura 2) resulta algo menos clara que en los casos anteriores. Ello se debe a cierta superposición de una tendencia vertical (desde la parte negativa a la positiva del eje II) y otra en sentido diagonal (del tercer al

primer cuadrante), aunque los cultivares menos lignificados tienden a situarse preferentemente en el tercer cuadrante. En consonancia con esto, las seis reflectancias se relacionan con los niveles de lignina, aunque las más directamente implicadas parecen ser las mismas que antes se indicaron para proteína, pero en este caso concreto también R_6 ejerce cierta influencia. Estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos por GARCÍA CRIADO y col. (1978), donde se indican las longitudes de onda óptimas para la estimación de las distintas fracciones.

Una vez descritas las regularidades más notables a nivel de grupo, parece conveniente llevar a cabo un estudio individual de cada uno de los cultivares analizados. Con este fin, en la figura 3 se representan los seis valores de reflectancia (R_i') para cada uno de los 61 cultivares de *T. subterraneum*. Como se indicó en material y métodos, estos datos resultan de restar a cada una de las reflectancias el valor del disco cerámico. Además, en dicha figura se expresan los valores resultantes del sumatorio de los datos R_i' antes referidos ($\Sigma R_i'$).

En cuanto a las reflectancias, R_i', con un valor aportado por el disco cerámico de 671, presenta entre todos los cultivares un ancho de banda de 138 unidades (o bien 13.8, como se indica en la figura), oscilando entre 123 y 261. R_2' manifiesta menor variabilidad (126 unidades), desde —25 a 101; con valores negativos (R_2 es inferior a la reflectancia del disco cerámico, es decir a 825) en los cultivares *cv. Can 434 A* (n.º 8), *cv. Daliak* (n.º 11), *cv. Spencers Brook* (n.º 13), *cv. Dalkeith* (n.º 18), *cv. Midland A* (n.º 19) y *cv. 69988* (n.º 35), todos ellos australianos excepto el último, procedente de Turquía. R_3' con un ancho de banda de 183 unidades (desde —60 hasta 123) también presenta en algunas ocasiones signo negativo, frente a la reflectancia del disco cerámico (650). En este caso se encuentran *cv. Daliak* (n.º 11), de origen australiano, *cv. 70058 A* (n.º 41), *cv. 69970 A* (n.º 42), *cv. 699973 A* (n.º 43), procedentes de Túnez.

La R_4' se mueve entre 27 y 156 (ancho de banda de 129), con todos los valores de R_4 superiores al del disco cerámico (765). R_5' presenta a veces signo negativo, oscila desde —14 hasta 81 (intervalo de 95 unidades), tomándose ahora como nivel base 753. Los valores inferiores a cero corresponden a *cv. Can 434 A* (n.º 8), *cv. Daliak* (n.º 8), *cv. Daliak* (n.º 11), *cv. Spencers Brook* (n.º 13) y *cv. Midland A* (n.º 19), todos ellos australianos; y *cv. 69988* (n.º 35), procedente de Turquía. Por último, R_6' resulta en todos los casos de signo negativo, al ser los valores de R_6 infe-

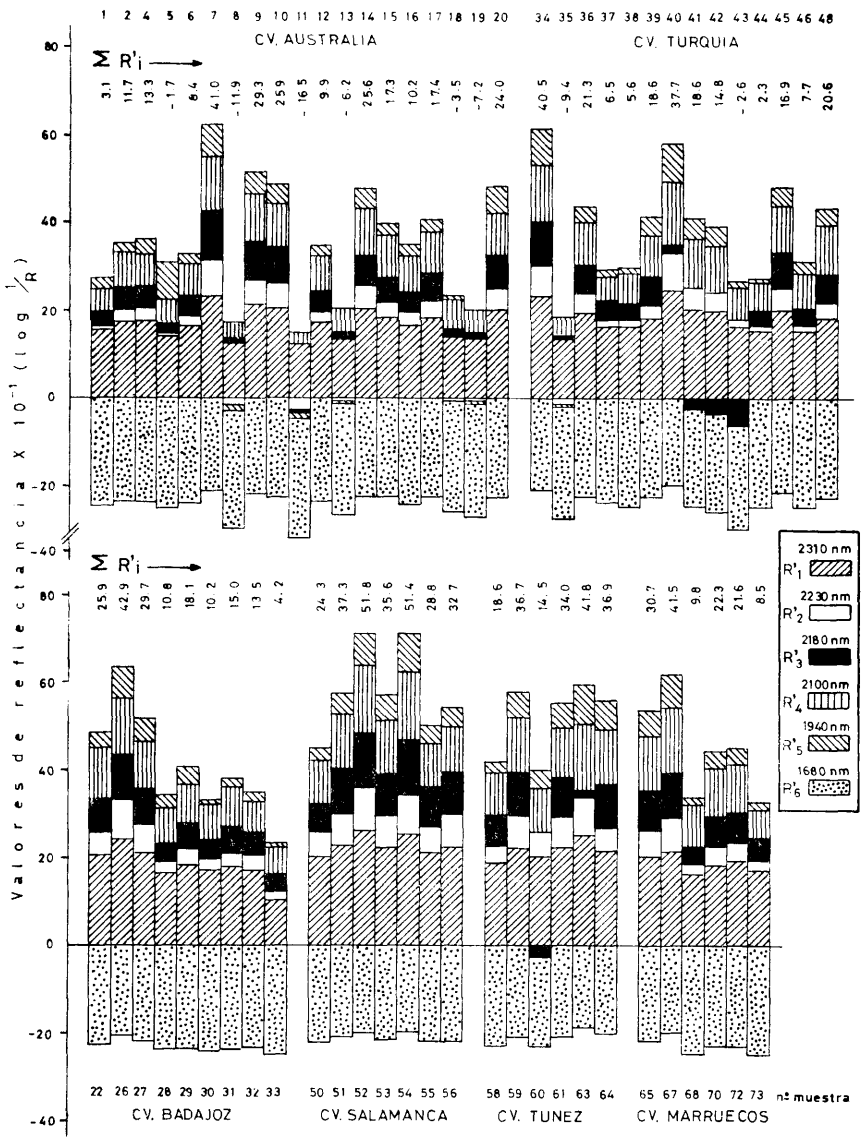

Fig. 3.—Representación gráfica de los valores de reflectancias a seis longitudes de onda para cada cultivar de *T. subterraneum*.

riores al del disco cerámico (610). Su intervalo de oscilación, de 83 unidades (desde —269 hasta —186), es el más estrecho de los observados, lo que da lugar a bandas de tamaño muy similar entre todas las muestras representadas.

En cuanto a los cultivares, se hace de nuevo patente la mayor variabilidad de los procedentes de Australia y Turquía. En

el caso de los australianos, Σ R_i' varía desde —16.5 hasta 41.0, mientras que para los originarios de Turquía la oscilación se produce desde —9.4 hasta 40.5. Los restantes grupos resultan bastante más homogéneos, con un solo caso de valor negativo para reflectancias distintas de R_6' (R_5' en *cv. 65188 E* n.º 60, de Túnez). Sin embargo subyacen peculiaridades en el seno de cada uno de los grupos, como se ha puesto de manifiesto en la discusión de resultados anteriores. Los mayores valores de Σ R_i' corresponden a cultivares salmantinos, y especialmente a *cv. CC 34.3* (n.º 52) y *cv. CC 35.2* (n.º 54). Por otro lado, es especialmente interesante resaltar que a pesar de la similitud entre las muestras consideradas, los valores de Σ R_i' son distintos en todos los casos, lo que pone de manifiesto que la diferenciación de los cultivares es posible mediante la utilización de valores de reflectancia.

Conclusiones

Mediante la espectroscopía de la reflectancia en el infrarrojo cercano es posible la diferenciación de cultivares de una misma especie. En este estudio se ha puesto de manifiesto que, a pesar de la similitud entre los 61 cultivares de *T. subterraneum*, cultivados en un mismo lugar geográfico y tomando muestras en similar estado fenológico, se hacen claras las diferencias entre cultivares, destacando aquellos que sobresalían al realizar estudios basados en análisis químicos.

La utilización de los valores de reflectancia como variables permite la obtención de configuraciones características y típicas de cada cultivar, como una primera aproximación a su espectro de reflectancia.

Agradecimiento

Los autores agradecen la ayuda técnica prestada por L. García, J. C. Estévez, M. A. Sánchez y M. Hernández.

BIBLIOGRAFIA

BARNES, R. F. (1981). Infrared reflectance spectroscopy for evaluating forages. Reprinted from Forage evaluation: concepts and techniques. Edited by J. L. Wheeler, R. D. Mochrie. CSIRO.

BARTELS, H. (1983). First experiences with the infraalyzer 400 LR in respect to identification and quantification of chemical compounds. Abstr. Int. Symp. N.I.R.A., París.

BARTON, F. E. and COLEMAN, S. W. (1981). Potential of near infrared reflectance spectroscopy for measuring forage quality. Oklahoma Agr. Expt. Stat. Misc. Publ. 108, 73-76.

BENZECRI, J. P. (1970). L'analyse des données. II. L'analyse des correspondances. Dunod. París.

COME, I. (1980). Forage analysis. Meet. to discuss the use of NIR for forage analysis, held at the Pennyhill Park Hotel, Bagshot, Surrey. U.K.

GARCÍA CIUDAD, A., GARCÍA CRIADO, B. y GARÍA BELLIDO, I. (1983). Análisis rápido de especies herbáceas por espectroscopía de la reflectancia en el infrarrojo cercano. An. Edafol. Agrobiol. 42, núms. 9-10, 1.643-1.653.

GARCÍA CIUDAD, A., GARCÍA CRIADO, L. y GARCÍA CRIADO, B. (1984). Nivel y producción de proteína en cultivares de trébol subterráneo. Studia Oecologica 3 (1): 77-85.

GARCÍA CRIADO, B., LEÓN MORÁN, L. y GARCÍA CIUDAD, A. (1978). Análisis y evaluación automática de forrajes por espectroscopía (R. I.) Longitudes de onda óptimas. Pastos 8, núm. 2, 311-323.

GARCÍA CRIADO, B., GARCÍA CIUDAD, A. RICO RODRÍGUEZ, M. and GARCÍA CRIADO, L. (1985). Nutritional quality of subterranean clover cultivars in West Central Spain. XV Int. Grassl. Congr., Kyoto, Japón.

GIL, A. (1978). Métodos de análisis multivariante en ecología. Aplicaciones a una comunidad herbácea heterogénea. Tesis doctoral. Univ. Sevilla.

GOERING, H. K. and VAN SOEST, P. J. (1970). Forage fiber analysis. Agric. Handb. 379, U.S.D.A.

JENSEN, J. L. (1983). The New wave in forage testing. Farming with pride, 3, núm. 1, 4-9.

MUSLERA, E. y RATERA, C. (1984). Praderas y forrajes. Producción y aprovechamiento. Mundi-prensa. Madrid.

RICO, M., GARCÍA CRIADO, B. y PUERTO, A. (1983). Diferenciación de especies herbáceas y sus estados de madurez mediante la utilización de fracciones orgánicas y valores de reflectancias (N.I.R.). Pastos 13, núm. 1-2, 47-63.

STARK, E. (1983). Discriminant analysis, a technique for qualitative analysis. Abstr. Int. Symp. N.I.R.A., París.

TEMPLETON, W. C., SHENK, J. S., NORRIS, K. H., FISSEL, G. W., MARTEN, G. C., ELGIN, J. H. and WESTERHAUS, M. O. (1981). Forage analysis with near-infrared reflectance spectroscopy: Status and outline of national research project. Proc. 14th Int. Grassl. Congr. Lexington. Kentuky, USA, Ed. J. A. Smith and V. W. Hays, 528-531.

CHARACTERIZATION OF *TRIFOLIUM SUBTERRANEUM* L. CULTIVARS BY NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY

SUMMARY *

For the first time an attempt has been made to characterize different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. by near infrared reflectance spectroscopy (N.I.R.S.). To do so, samples from 61 cultivars of subterranean clovers of different origins, naturalized in Australia and cultivated in the province of Salamanca (Spain), were used.

The results obtained show that the value of six reflectance considered exhibit a normal distribution, though certain particular variations could be observed.

The application of correspondence analysis to the reflectance data matrix (log 1/R) gave an ordering of the cultivars on the principal plane, which, according to their origin, highlights the most precise grouping of those from Salamanca, Badajoz and Tunisia, principally. Furthermore, considering different ranges of protein, hemicellulose and lingnin contents in the cultivars, the reflectances most related to proteins were R_4, R_5, R_3 and R_1, from greatest to smallest content in this fraction. Regarding hemicellulose, R_3, R_4 and R_5 were outstanding, with R_1 and R_4 following them in order of importance, whereas for lignin six reflectances are involved.

Each of the cultivars was characterized by a value (R_i') obtained as the sum of differences between the directly measured reflectances and those correspondig to the ceramic disc.

---

* KEY WORDS: Subterranean clover, *Trifolium subterraneum* L., cultivars, characterization, near infrared reflectance spectroscopy.