

**Koundukdjian, Juan Martín**

*Complementariedad y diferencias en métodos de análisis químicos para la determinación de compuestos de la pared celular de tallos de Lotus tenuis y Botriocloa laguroides*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria  
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Koundukdjian, J. M. 2015. Complementariedad y diferencias en métodos de análisis químicos para la determinación de compuestos de la pared celular de tallos de Lotus tenuis y Botriocloa laguroides [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/complementariedad-diferencias-analisis-quimicos.pdf> [Fecha de consulta:.....]



# UCA

Facultad de Ciencias Agrarias

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Ingeniería en Producción Agropecuaria**

**Complementariedad y diferencias en métodos de análisis químicos para la determinación de compuestos de la pared celular de tallos de *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides***

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:**

**Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Juan Martín Koundukdjian

Profesor Tutor: Ing. PA María Elena Vago (Msc)

Dra. Marina Ciancia

Dr. Jorge Zavala

Fecha: 2015

## COMPLEMENTARIEDAD Y DIFERENCIAS EN MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE LA PARED CELULAR DE TALLOS DE *LOTUS TENUIS* Y *BOTRIOCLOA LAGUROIDES*

En la zona de la Pampa inundable, se ubica una de las principales regiones de cría de ganado vacuno de la Argentina. La misma se encuentra cubierta mayoritariamente por pastizales naturales que se hallan sometidos a estreses como ser sequías e inundaciones periódicas que conjuntamente con el pastoreo continuo y selectivo (estrés biótico) provocan alteraciones en su estructura. Entre las especies forrajeras de importancia para la ganadería en este ambiente con restricciones se destacan *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides*. Cada estrés, sea de origen abiótico o biótico, activa una serie de respuestas que permiten la adaptación de las plantas a esa condición. Si bien es poco lo que se sabe, actualmente se encuentra documentado que la herbivoría produce cambios sistémicos en la biosíntesis y degradación de los diferentes biopolímeros que constituyen las paredes celulares.

El objetivo del presente trabajo es el de estimar complementariedad y diferencias en métodos de análisis químicos utilizados en la determinación de compuestos de la pared celular de muestras de tallos de *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroide* pastoreadas y sin pastorear a lo largo de su ciclo de crecimiento. Se analizaron muestras de tallos secas y molidas obtenidas del Establecimiento El Grillo, Partido de Tapalqué, Prov de Buenos Aires. Sobre las mismas se realizó por una parte la determinación de fibra detergente ácido (%FDA) y de lignina (%Lig/FDA) por el método de Van Soest (Ankom Technology), considerados como “métodos tradicionales”, es decir, los habitualmente utilizados en Nutrición animal. Por otra parte se realizaron extracciones secuenciales con solventes y agua caliente para obtener la pared celular y sobre ese material se realizó la determinación del contenido total de hidratos de carbono por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956) y el contenido de ácidos urónicos por el método de Filisetti-Cozzi et al. (1991) considerados como “métodos no tradicionales” en este trabajo, por ser utilizados habitualmente en trabajos de investigación, y no para controles de rutina, siendo mas trabajosos, pero mas detallados. Las determinaciones químicas de contenido de azúcares totales y contenido de ácidos urónicos utilizadas en este ensayo, contribuyeron a una mejor caracterización de la especie *Lotus tenuis* a utilizarse como forrajera, ya que permitieron detectar diferencias debido al pastoreo que no se evidenciaban con los resultados de las determinaciones de %FDA y % lignina. En el caso de *Botriocloa laguroide* esta complementariedad metodológica no se observó, seguramente debido al menor contenido de pectinas que caracteriza a las Poáceas.

## INDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
A. Efecto de las condiciones de estrés sobre la pared celular.....	5
B. Importancia nutricional de la PC .....	6
C. Descripción polisacáridos.....	7
D. Descripción lignina.....	7
E. Métodos analíticos para caracterizar la PC.....	8
F. Pared celular y digestibilidad .....	9
G. Pared celular y consumo voluntario .....	10
H. Estructura de la Pared Celular .....	11
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>16</b>
A. <i>Lotus tenuis</i> .....	16
B. <i>Botriocloa laguroides</i> .....	19
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>22</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>23</b>
<b>VII. ANEXO I: TABLAS DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS - <i>LOTUS TENUIS</i></b> .....	<b>26</b>
<b>VIII. ANEXO II: TABLAS DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS - <i>BOTRIOCLOA LAGUROIDES</i></b> .....	<b>28</b>

## I. Introducción

En la zona de la Pampa inundable, también conocida como Cuenca del Salado, se ubica una de las principales regiones de cría de ganado vacuno de la Argentina. La misma se encuentra cubierta mayoritariamente por pastizales naturales, que se hallan sometidos a sequías e inundaciones periódicas, determinantes de situaciones de estrés salino que, conjuntamente con el pastoreo continuo y altamente selectivo provocan alteraciones en su estructura y funcionamiento (Deregibus y Soriano, 1981). Entre las especies forrajeras de importancia para la ganadería en este ambiente con restricciones se destacan *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides*.

*Lotus tenuis* es una especie adaptada tanto a suelos bajos e inundables como a aquellos con alto contenido en sodio y con períodos de inundaciones y sequías cíclicas (Carrillo, 2003). *L. tenuis* se encuentra naturalizado en la Cuenca del Salado y es una de las pocas leguminosas estivales de valor forrajero con las que se puede trabajar en ambientes de este tipo. Entre los atributos que pueden explicar el éxito de su propagación se citan la variabilidad genética de sus poblaciones, la plasticidad fenotípica de las plantas, su tolerancia al anegamiento y la dispersión por animales (Vignolio y Fernández, 2006).

*B. laguroides* es una Poácea de tipo fotosintético C<sub>4</sub> que ha despertado atención en los últimos años principalmente por su plasticidad, encontrándose en el tapiz natural de prácticamente todos los ambientes productivos de la Argentina según relevamientos hechos por el INTA para su Inventario de Forrajeras. Caracterizan a este recurso su rusticidad, adaptación a regiones semiáridas tropicales y subtropicales con lluvias de verano, resistencia a la sequía, alta persistencia, y un patrón de crecimiento eminentemente estival (Veneciano et al., 2004).

El aprovechamiento potencial que hagan los rumiantes en pastoreo de estas especies forrajeras dependerá esencialmente de su composición química, primero respecto a la disponibilidad de los componentes de la pared celular y del contenido celular y segundo a la presencia de estructuras orgánicas e inhibidores que impidan o limiten la disponibilidad de los componentes de la pared y del contenido celular con los que se encuentran asociados (Van Soest, 1994). Aproximadamente del 35 al 80 % de la materia orgánica de los tejidos vegetales está contenida en la pared celular (Jung, 1995). Las paredes celulares vegetales son estructuras complejas y dinámicas compuestas fundamentalmente por polisacáridos de alto peso molecular, glicoproteínas y lignina (Somerville, et al 2004), y sus propiedades dependen de los polisacáridos que las componen y de la manera en la que se encuentran interconectados para formar la estructura tridimensional de la pared celular (Jarvis, 2011).

El principal componente en la alimentación del ganado vacuno en Argentina es el forraje obtenido directamente en pastoreo (Elizalde y Riffel, 2013). Según cálculos de Elizalde, el 91,9% de los requerimientos totales de una ganadería de ciclo completo con terminación a corral son aportados por los forrajes de volumen, en los cuales, como ya se ha mencionado, la pared celular es el principal componente. En este tipo de alimentación tanto el consumo voluntario como la digestibilidad del alimento consumido se ven altamente influenciados por la composición de la pared celular, y más precisamente, del grado de lignificación de la pared, concepto que será motivo de discusión más adelante en este trabajo. El mejoramiento genético vegetal y los

genetistas moleculares están interesados en aumentar la calidad de los forrajes, pero requieren de la guía de la ciencia animal para conocer qué características de las plantas deben ser modificadas para lograr el progreso deseado en la producción animal (Buxton and Casler, 1993).

En alimentación animal, normalmente se utiliza el término "fibra" como equivalente a pared celular, sin embargo, es conveniente analizar con mayor profundidad el significado concreto de cada uno de estos términos. La fibra es un producto analítico que tiene ciertas características nutricionales y abarca a aquellos componentes del forraje que tienen baja solubilidad en un sistema específico de solventes y son relativamente menos digestibles que el almidón (Jung, 1995). Por otro lado, la pared celular es una estructura biológica compleja que contiene varias moléculas diferentes cuya biosíntesis es controlada por enzimas y regulada por genes (Iiyama et al., 1993). Si las herramientas de la genética molecular van a ser empleadas para mejorar la calidad de los forrajes, entonces la fibra e incluso el contenido total de pared celular, no son indicadores convenientes de la calidad forrajera (Jung, 1995). De estos conceptos es que surge la necesidad de encontrar y validar, métodos analíticos más específicos para determinar la composición de la pared celular de las especies de importancia del tapiz natural, en este caso de la Cuenca del Salado como lo son *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides*.

#### **A. Efecto de las condiciones de estrés sobre la pared celular.**

En su hábitat natural, las plantas encuentran estreses múltiples que las afectan simultáneamente. Cada estrés, sea de origen abiótico como biótico, activa una serie de respuestas que permiten la adaptación de las plantas a esa condición (Ryan 2000). Las plantas constantemente modifican sus patrones de crecimiento para ajustarse a los cambios medioambientales. El estrés ocurre cuando un agente estresante induce un cambio fisiológico, que produce una reducción en el crecimiento, un cambio en el metabolismo o una combinación de todas ellas. Por otro lado, las condiciones de estrés biótico, como la herbivoría producida por insectos u otros animales genera una serie de respuestas a nivel vegetal que dependerán del bioagresor que se trate. Las respuestas serán de índole constitutiva o inducida. Las respuestas constitutivas o estructurales incluyen barreras físicas como ser ancho de cutícula, composición de la pared celular y presencia de metabolitos secundarios que inhiben la alimentación, tasa de reproducción o el desarrollo de los herbívoros (Walling 2000).

Las respuestas inducidas también varían de acuerdo al bioagresor de que se trate y dependen de mecanismos de activación directos e indirectos que incluyen la síntesis hormonal y la síntesis de metabolitos secundarios. Las defensas químicas producidas pueden ser entre otras: alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos y acetilénicos. Estos compuestos químicos inducidos pueden actuar interfiriendo en el metabolismo animal, o bien aumentando la resistencia de las plantas frente a herbívoros afectando la atracción o aversión al consumo (Van Soest 1994; Zavala 2006; Zavala et al. 2008). Si bien es poco lo que se sabe, actualmente está bien documentado que la herbivoría produce cambios sistémicos en la biosíntesis y degradación de los diferentes biopolímeros que constituyen las paredes celulares (Giordanengo et al. 2010). Existen estudios que relacionan la composición de carbohidratos (pectina) de la pared celular vegetal con la deposición de calosa en la pared como factores importantes en la susceptibilidad de las plantas al ataque fúngico (Dreyer 1987; Vorwerk et al. 2004). La relación pectinas-calosa, también puede tener importancia en la interacción planta-insecto (Dreyer 1987; Botha 2004).

Las plantas han desarrollado en el tiempo estrategias anatómicas y químicas para resistir adversidades abióticas y bióticas. A diferencia de los animales, las respuestas inmunológicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en la respuesta de cada célula y señales sistémicas emanadas de los sitios afectados (Jones y Dangl, 2006; Dangl y Jones, 2001; Ausubel, 2005). Gran parte de estas resistencias se deben a sus paredes celulares, cuya función es darle forma, rigidez, resistencia mecánica y protección frente a organismos patógenos, depredadores y adversidades medioambientales (Buxton, 1993; Brett y Waldron, 1990; Somerville, et al 2004). El aumento de la producción de defensas químicas está regulado por fitohormonas, como etileno y ácido jasmónico (AJ) que modulan una serie de respuestas. Al AJ se lo asocia generalmente con las respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos, incluyendo déficits hídricos y herbivoría (Zavala *et al.*, 2008; Balbi *et al.* 2008; Sánchez-Rodríguez *et al.* 2010). El daño foliar incrementa la acumulación de la hormona vegetal ácido jasmónico (AJ) en la células de las plantas, disminuyendo su crecimiento y aumentando la acumulación de metabolitos secundarios de defensa (Roger y Campbell, 2004; Ellis et al., 2002; Howe y Jander, 2008; Browse, 2009). La aplicación exógena de AJ, como metil jasmonato, ha demostrado su efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas, y positivo sobre la biosíntesis de celulosa, y a su vez, incrementa la producción de compuestos fenólicos y antinutritivos (Zavala et al., 2004a, b; Howe y Jander, 2008 Neupane & Norris, 1990; Sharma & Norris, 1991; Hoffmann-Campo *et al.*, 2001). Debido a esto podrían encontrarse variaciones en la composición de las paredes celulares pastoreadas versus las no pastoreadas que podrían afectar el posterior aprovechamiento de las especies en pastoreo.

## **B. Importancia nutricional de la Pared Celular**

Los animales rumiantes han evolucionado con la habilidad de utilizar como recurso nutritivo el material vegetativo de las plantas (Hofmann, 1989). El rumen permite la utilización de forrajes a través de una relación simbiótica con microorganismos capaces de fermentar polisacáridos de la pared celular de las plantas que no son susceptibles a la hidrólisis enzimática de los mamíferos (Hungate, 1966). El principal aprovechamiento de la pared celular durante la digestión ruminal es como fuente de energía, no obstante, buena parte de la importancia nutricional de la misma radica en el efecto que su presencia causa sobre la digestibilidad total del material y el consumo voluntario de los animales. La reducción en la proporción de pared celular podría mejorar la ingesta y la densidad energética de los forrajes; aumentando la digestibilidad de la pared celular se podría mejorar la disponibilidad de energía (Jung y Allen, 1995).

La pared celular se encuentra constituida principalmente por polisacáridos, proteínas, y lignina (Aman, 1993). Mientras que todas las paredes celulares comparten ciertas características químicas básicas, existen fuertes diferencias entre los tejidos vegetales en concentración, composición y organización estructural de la pared celular (Jung, 2012). Las diferencias entre varios tipos celulares en la composición y estructura de la pared celular podría reflejar diferentes necesidades de elasticidad, movilidad de distintos tipos de iones en la pared o equilibrio con respecto a la señalización de patógenos (Somerville et al., 2004).

A continuación se buscará dar una descripción sintetizada de la composición de la pared celular para las familias de las especies en estudio, *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides*, así como también su patrón de variación a través de su ciclo de vida buscando su relación con el potencial de aprovechamiento animal. Para una

caracterización más completa de la estructura molecular de la pared celular vegetal ver Carpita y Gibeaut (1993).

### **C. Polisacáridos de Pared Celular**

Los polisacáridos de la pared celular de los forrajes son complejos difiriendo extensamente en propiedades físicas y efectos nutricionales (Graham et al., 1990). El desarrollo de métodos de análisis más sofisticados y exactos para el análisis de los polisacáridos de la pared celular vegetal se debe a que se ha comprendido que estos no solo son componentes de rendimiento energético, sino que también pueden controlar la utilización de otros componentes de las dietas (Aman y Graham, 1990).

La celulosa es el componente más abundante de la pared celular y está compuesta exclusivamente de cadenas lineares de  $\beta$ -D-glucosa. La molécula extendida forma una cinta plana, la cual adquiere rigidez por los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Estos enlaces de hidrógeno producen una disposición cristalina regular de la cadena de unidades de glucosa, que controla las características físicas y químicas de la celulosa (Aman, 1993).

El resto de los polisacáridos de la pared pueden agruparse en dos grupos, hemicelulosas y pectinas (Jung, 2012). Las hemicelulosas son un gran grupo de polisacáridos compartiendo básicamente la propiedad de poder ser extraídos de las paredes utilizando soluciones alcalinas y de ser capaces de enlazarse a la celulosa por múltiples enlaces hidrogeno (Albersheim et al., 1984). Incluyen xilanos, xiloglucanos y mananos (Aman, 1993). Somerville et al. (2004) indica que las hemicelulosas son polisacáridos ramificados, conteniendo un esqueleto de azúcares neutras, que pueden formar enlaces de hidrógeno con la superficie de las fibrillas de celulosa.

Las pectinas son un conjunto de polisacáridos aún más diversos, compartiendo la propiedad de ser solubles en soluciones acuosas de quelantes de calcio, como el ácido oxálico (Jung, 2012). Este grupo de polisacáridos se encuentra en la lámina media de la pared celular primaria y son más abundantes en dicotiledóneas que en las monocotiledóneas. Las pectinas se caracterizan por la presencia de ácidos urónicos como principales componentes (Somerville et al., 2004). En ambas, dicotiledóneas y monocotiledóneas, se han caracterizado estructuralmente tres polisacáridos, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II y homogalacturonano (O'Neill et al., 1990). Se ha propuesto que las pectinas son importantes para el control de la porosidad de la pared, la adhesión de células continuas y en el control del ambiente iónico de la pared celular (Somerville et al., 2004). Mcneil et al. (1984) indica que las pectinas sirven como moléculas de reconocimiento que señalan el desarrollo de respuestas adecuadas a organismos simbióticos, patógenos e insectos.

### **D. Lignina**

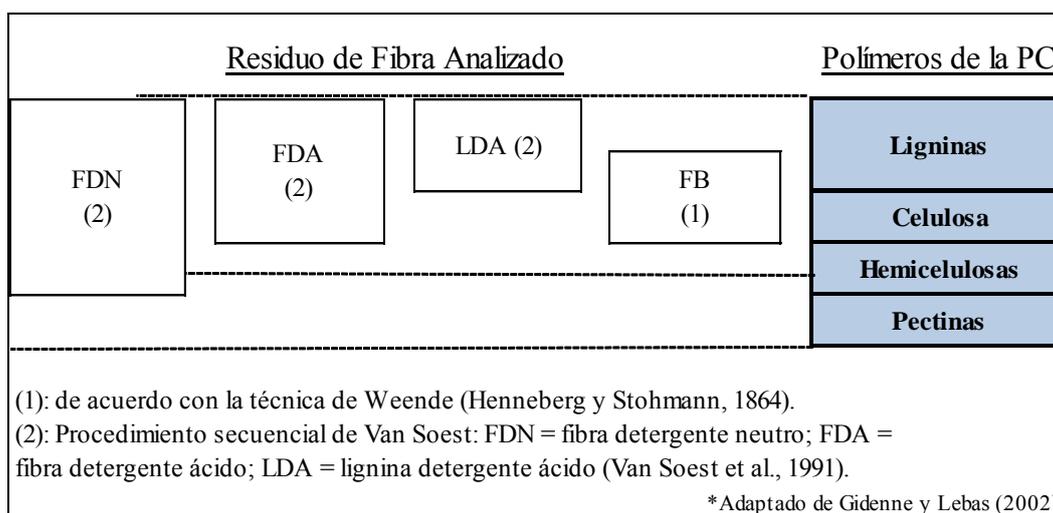
No es objeto de este trabajo ahondar en la problemática de la definición de la lignina, sino dar una descripción de la misma aplicable a la nutrición de los rumiantes en pastoreo. En este sentido, es preciso considerar a la lignina como un polímero de alcoholes hidroxicinámílicos depositados en la pared celular, al que se le pueden enlazar ácidos fenólicos y no fenólicos durante la reacción de radicales libres que conduce a su polimerización (Jung y Allen, 1995). La complejidad estructural de la lignina y las dificultades que se encuentran en su aislamiento y estudio estructural debido a su insolubilidad e inercia química hacen que se convierta en un desafío lograr definirla en forma abarcativa y coherente en unas pocas líneas. Según el punto de vista desde el que se encare su estudio se pueden encontrar diversas formas de definirla que se relacionan

con la metodología utilizada para su aislamiento y/o caracterización. A su vez, los distintos métodos de laboratorio que buscan aislar la lignina de una muestra de material vegetal, arrojan un extracto que contiene distintos residuos, de modo que existe una definición para la lignina del método de Klason, otra para la lignina del método de fibra en detergente ácido y conceptos como el de lignina principal (Van Soest, 1994).

### E. Métodos analíticos para caracterizar la Pared Celular

En alimentación animal existen dos métodos tradicionales para caracterizar la calidad nutricional de los forrajes: el método de Weende y el de Van Soest. Si bien ninguno de los dos es preciso en términos bioquímicos ambos han demostrado su utilidad principalmente a la hora de formular raciones.

El método de Weende es el más difundido por su simpleza se basa en la extracción de un residuo llamado Fibra bruta (FB) a través de hidrólisis ácida y básica. La FB abarca una mezcla de lignina, celulosa, cutinas y otros componentes que comparten la característica de ser indigestibles para la gran mayoría de los monogástricos domésticos y, por tanto, es para la alimentación de estos animales que es de utilidad ya que esta fracción no será aprovechable dependiendo del animal que la consuma.



**Figura 1: Métodos gravimétricos para la determinación de fibra en alimentación animal**

Sin embargo, al evaluar la calidad nutritiva de las especies forrajeras destinadas a alimentación de rumiantes se utiliza el método de Van Soest, ya que se obtiene una caracterización más precisa de la fracción fibra, diferenciando aquellos constituyentes aprovechables de los no aprovechables para los animales poligástricos. Por este método se obtienen los parámetros de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina (Lig/FDA). La técnica se basa en el fraccionamiento de la pared celular y en la obtención de un residuo de fibra libre de contaminantes como proteínas, a través de la actividad combinada de detergentes (neutro y luego ácido). El valor FDN contiene hemicelulosa, celulosa y lignina, luego con el lavado con detergente ácido se elimina la hemicelulosa y se llega al valor de FDA que abarca lignina y celulosa. Como desventaja se puede señalar que en este método se pierden en la etapa inicial las pectinas y, por otro lado, se hace muy dificultoso eliminar por completo las proteínas de los residuos.

Como se ha señalado al comenzar este apartado, ambos métodos han sido y siguen siendo de gran utilidad para predecir el valor nutricional de los alimentos con destino animal. No obstante, existen otras determinaciones mucho más específicas a

nivel de laboratorio que detectarían variaciones a nivel de la pared celular que podrían afectar también a los parámetros resultantes de los métodos tradicionales y que no están siendo detectadas por estos últimos.

#### **F. Pared celular y digestibilidad**

En alimentación de animales monogástricos, con excepción de algunas especies, se asume que prácticamente la totalidad de la pared celular vegetal carece de valor nutricional por no ser digestible. En cambio, en rumiantes, la pared celular es de gran importancia para la alimentación, en primer lugar porque una buena parte de la misma puede ser digerida y, en segundo lugar, porque el contenido de pared de un forraje afectará el consumo del mismo. Si bien ya se han explicado con claridad las diferencias entre los distintos conceptos como contenido de pared celular, lignina, FDA y FDN, de alguna manera estos efectos que se mencionan se ven representados por la correlación inversa existente entre FDA y digestibilidad y FDN y consumo voluntario (CV) (Van Soest, 1994; Jung, 2012).

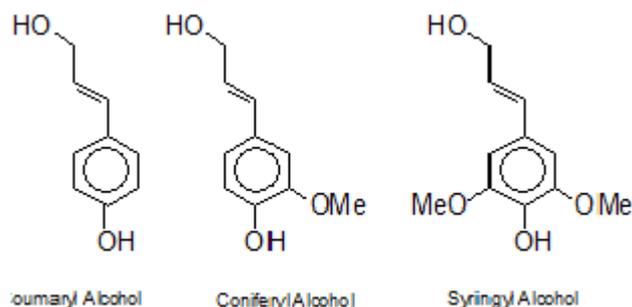
Si bien el contenido total de pared celular de *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides* varía a través de su ciclo de vida, en todas estas etapas es considerable la magnitud de la misma, hecho que los define como forrajes de volumen. En este sentido es que la propia digestibilidad de la pared celular aparece como un punto a estudiar con detenimiento.

Debido a que la lignina es un componente de la pared celular, se asume que su efecto sobre la digestibilidad del forraje radica en una influencia directa sobre la digestibilidad de la pared más que sobre la digestibilidad total de la planta (Van Soest, 1993). En concreto, la lignina afecta la accesibilidad de los polisacáridos constituyentes de la pared celular interponiéndose físicamente entre las enzimas de la hidrólisis y los polisacáridos (Jung y Deetz, 1993).

Distintos autores han reportado correlación negativa entre la concentración de lignina y la digestibilidad, sin embargo existen algunos estudios que no han encontrado correlación entre estos dos indicadores. Jung se ha encargado de analizar y esclarecer esta discrepancia en los resultados. Los trabajos en los que se ha encontrado correlación negativa entre la concentración de lignina y la digestibilidad de la pared celular son aquellos en los que el análisis se realiza sobre una determinada especie en distintos grados de madurez. En cambio, aquellos en los que no se reporta correlación se tratan de trabajos que comparan la concentración de lignina y la digestibilidad de la pared celular en diversas especies cosechadas en un mismo y único estado de madurez. Es por esto que la concentración de lignina puede ser tomada como un indicador válido a la hora de predecir el valor forrajero de una especie pero no así para comparaciones entre especies o bien variedades de una misma especie en programas de mejoramiento genético (Jung, 2012).

Hasta el momento no se ha podido comprobar fehacientemente si hay efecto del tipo de lignina sobre la digestibilidad de la pared celular. Como ya se ha descrito, a medida que la planta madura la composición de la lignina se transforma mayormente en el tipo siringil (S) y hay una reducción en el tipo guaiacyl (G). La figura 1 muestra la estructura química de estas unidades. La mayor parte de los estudios que pretenden demostrar un efecto en el tipo de lignina sobre la digestibilidad de la pared celular se han hecho sobre mutantes bmr de sorgo y maíz, en los cuales no solo hay una menor cantidad de lignina del tipo siringil sino que también hay una menor concentración de lignina total en la pared celular en la madurez avanzada. Por lo tanto la mayor digestibilidad comparada con los genotipos comunes no puede ser atribuida directamente a la composición de la lignina sino también a su concentración (Jung,

2012). A su vez, estudios hechos en *Arabidopsis thaliana*, sobre la que se eliminó por completo la lignina del tipo S, sin reducir la concentración total de lignina no han mostrado alteración en la digestibilidad de la pared celular. Sin embargo en estos estudios se ha trabajado con material vegetal con un alto grado de madurez y es posible que el efecto del tipo de lignina en la digestibilidad se produzca en estadios juveniles (Jung y Allen, 1995).



**Figura 2: Los tres monómeros fenil propano de la lignina, precursores de las unidades H, G y S, respectivamente.**

### G. Pared celular y consumo voluntario

La cantidad de forraje consumido es el determinante principal de la producción animal bajo planteos pastoriles y aún es uno de los aspectos más difíciles de la calidad de los forrajes. Esto es debido a que los factores del animal como la especie, el grado de engrasamiento y el estado fisiológico entre otros, tienen una gran influencia en la ingesta de un determinado alimento así como también el ambiente en que estos se encuentran (Buxton, 1996; McDonald et al., 2002).

Es ampliamente aceptado que existe una correlación negativa entre el contenido de fibra de los forrajes y el consumo voluntario de los rumiantes. Numerosos autores como Van Soest (1965); Mertens (1973); Osburn et al. (1974), han reportado resultados que comprueban esta correlación negativa que se explica por el llenado del tracto digestivo que produce la fracción fibra del alimento al demorar más tiempo en pasar el tracto gastrointestinal (Jung y Allen, 1995). Todos estos estudios han trabajado buscando correlacionar el indicador FDN con el consumo voluntario (CV), arrojando  $r^2$  de entre 0.53 y 0.77.

Para que el forraje atraviese el rumen requiere dos cosas, la reducción en el tamaño de partícula y el escape a través del orificio retículo-omasal (Mertens, 1994). Es lógico asumir que la reducción en el tamaño de partícula es un prerrequisito para el pasaje del alimento ya que el tamaño de partícula de la materia en las heces es menor al del alimento consumido y la reducción en el tamaño de partícula postruminal es muy pequeña (Jung y Allen, 1995). La pared celular de las plantas requiere ser masticada y digerida para reducir el tamaño de sus partículas y así poder pasar el orificio retículo-omasal (Buxton, 1996). En consecuencia, cuanto mayor sea el contenido de pared celular de un alimento, mayor será la necesidad de ser masticado y digerido para que se produzca dicha reducción en el tamaño de partícula. Esto causará mayor permanencia en el rumen produciendo un llenado físico del mismo que reduce el consumo voluntario en comparación a aquellos alimentos de menor contenido de pared celular que atraviesan rápido el rumen dejándolo disponible para el ingreso de más alimento.

La variación en el consumo voluntario que no es explicada por la FDN en dietas exclusivamente pastoriles se debe a dos factores: el CV de todos los animales no es limitado exclusivamente por el llenado físico del rumen y la FDN describe incompletamente el efecto de llenado físico de los alimentos (Jung y Allen, 1995). El

llenado físico que ejerce un alimento depende no solo de su contenido de fibra sino también del tamaño de partícula inicial con el que es entregado a los animales. De este modo, un alimento con mismo contenido de FDN pero peletizado puede ser consumido en mayor cantidad que uno en estado natural.

Para que una partícula pase a través del orificio retículo-omasal se requieren dos cosas, en primer lugar, que su tamaño sea menor que el diámetro del orificio y, en segundo lugar, que se encuentre próximo al orificio durante el tiempo suficiente como para que las contracciones del retículo la presenten al orificio. Jung y Allen (1995) explican que este segundo requerimiento se cumple cuando las partículas adquieren una alta gravedad específica funcional (FSG), que baja la capacidad para flotar de la misma y genera que se ubique en ventral y craneal del rumen. Inicialmente todos los alimentos en el rumen tienen una baja FSG debido a la gran cantidad de burbujas de gas contenidas en su superficie y dentro de los espacios vacíos de las partículas. A medida que avanza la fermentación la FSG disminuye debido a que la fracción fermentable de la fibra de la partícula y/o la habilidad de las células para retener burbujas de gas disminuyen y porque la tasa de remoción de gas excede a su tasa de producción. La cantidad de gas producido depende de la tasa de fermentación de la fibra potencialmente fermentable y de la fracción de la fibra que es potencialmente fermentable. Mientras que un incremento en la tasa de fermentación actúa aumentando la FSG a través del tiempo, una mayor proporción de fibra potencialmente fermentable extenderá el tiempo que los microorganismos asociados a las partículas se encuentran produciendo gases que hacen disminuir al FSG. Este mecanismo retiene selectivamente en el retículo-rumen a aquellas partículas que todavía tienen cantidades sustanciales de fibra fermentable remanente.

Los pastos generalmente tienen más cantidad de fibra potencialmente fermentable y menor tasa de fermentación que las leguminosas (Smith et al., 1972). Estas características harían que los pastos estén más tiempo flotando en el rumen debido a una mayor cantidad de gas asociado a partículas con mayor tiempo o de fermentación (Jung y Allen, 1995).

Otro factor que podría limitar el CV sería la digestibilidad de la fracción fibra, aunque la determinación experimental de este efecto se dificulta, ya que normalmente los materiales bajan la digestibilidad de su fibra al mismo tiempo que aumentan el contenido de la misma, por lo que es difícil separar los efectos. No obstante, algunos trabajos, como el de Muller et al. (1972) sobre mutantes bmr, en los que se sabe que la digestibilidad de la fibra es mayor que la de los genotipos comunes, han arrojado resultados que indicarían un incremento en el consumo voluntario debido a la mayor degradabilidad de la FDN.

## **H. Estructura de la Pared Celular**

La complejidad de la estructura de la pared celular subraya el desafío asociado a entender su estructura, función y síntesis (Somerville, et al., 2004). Hasta aquí se han descrito los polímeros que componen la pared celular, celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina, en forma independiente. Estos polímeros se encuentran organizados espacialmente formando una matriz que da estructura a la pared celular vegetal, esta estructura se describirá en las líneas siguientes ya que de alguna manera explica la forma en que los microorganismos del rumen atacan las células durante la digestión.

En las dicotiledóneas, la pared celular primaria comprende tres tipos de unidades estructurales independientes pero que interactúan entre sí. La primera unidad, la fundamental, es el esqueleto de celulosa y xiloglucanos (alrededor del 50% del total de la pared) y se encuentra embebida en una segunda unidad, constituida por la matriz de

polisacáridos pécticos (alrededor del 30% del total de la pared). La tercera unidad independiente consiste en las proteínas estructurales de la pared celular siendo la extensina la principal de ellas (Carpita y Gibeaut, 1993).

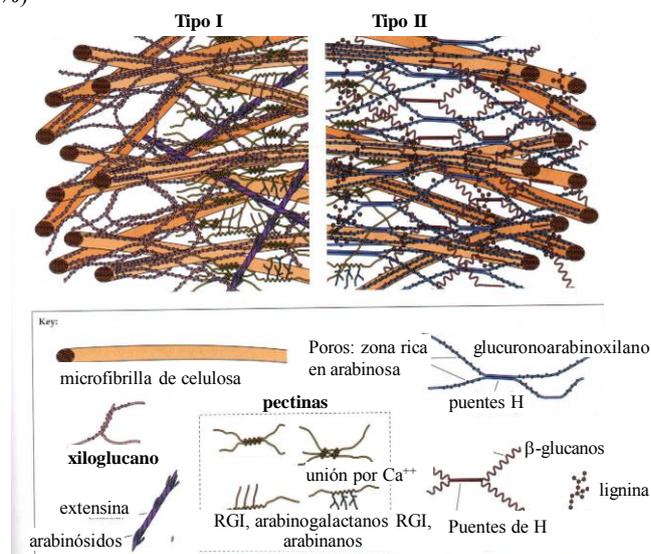
En los modelos anteriores, se proponía que todos los componentes se encontraban enlazados de forma covalente. En cambio, en el modelo actual, el esqueleto de celulosa-xiloglucanos se encuentra embebido en la matriz independiente de pectina sin necesidad de uniones covalentes. Los componentes de cada una de estas unidades estructurales pueden cambiar en forma independiente dependiendo del estado de desarrollo o en respuesta a tipos especiales de estrés (Carpita y Gibeaut, 1993).

La síntesis y ensamblaje de cada una de estas unidades es independiente de la otra (Shea et al., 1989). Las microfibrillas de celulosa, cuya biosíntesis tiene lugar en la membrana plasmática, son insolubles porque las cadenas de glucanos que interactúan lateralmente por medio de enlaces de hidrógeno y de van der Waals fuerzan la producción de estructuras cristalinas de las cadenas paralelas. Los otros polisacáridos son secretados como polímeros solubles que deben desplegarse y difundir dentro del ambiente acuoso de la pared hasta su destino final. Se especula que quizás se modifican luego de su secreción por la remoción de componentes estructurales (por ejemplo, ciertas ramificaciones) que facilitan su solubilidad, ya que algunos de estos componentes son insolubles cuando se extraen de la pared celular. A su vez, se ha propuesto que algunos polímeros se ensamblan dando estructuras de mayor peso molecular (y menos solubles) luego de su secreción en la pared (Somerville et al., 2004).

**Pared primaria** Paredes celulares jóvenes, células en crecimiento, contienen menor cantidad de celulosa (40%)

Tipo I:  
dicotiledóneas y  
monocotiledóneas  
no comelinoides

Tipo II:  
monocotiledóneas  
commelinoides  
(pastos, cereales)



**Figura 3: Pared celular de Dicotiledóneas y Monocotiledóneas. Fuente: Buchanan et al., 2000.**

Las Gramíneas como *Botriocloa laguroides*, tienen un tipo de estructura que difiere sustancialmente del descrito en párrafos anteriores. Este tipo de estructura está compuesta por similares microfibrillas de celulosa pero es aquí precisamente donde dicha similitud finaliza (Carpita y Gibeaut, 1993). En lugar de xiloglucanos, los polímeros principales que se entrelazan con las microfibrillas de celulosa son los glucronoarabinoxilanos (GAXs) (Carpita y Gibeaut, 1993). La pared celular de las Poáceas es notablemente pobre en pectinas, si bien desarrollan una marcada preferencia

por depositar pectinas metil esterificadas o no esterificadas en algunos tipos celulares como en las de los tejidos vasculares (Carpita y Gibeaut, 1993). Este tipo de pared celular se encuentra enriquecida en ferulato y ésteres de p-cumarato formados por unión de su grupo carboxilo al O-5 de las unidades arabinosa de los GAXs (Kato and Nevins, 1985). GAXs adicionales con diferentes sustituyentes y grado de ramificación podrían reemplazar funcionalmente a las pectinas predominantes en las paredes celulares de las otras familias vegetales, determinando la porosidad y la carga superficial de la pared en las Poáceas (Carpita y Gibeaut, 1993). A diferencia de lo que sucede en las leguminosas, en las que prácticamente la totalidad de los polisacáridos no celulósicos puede ser removida de la pared con álcali, una porción sustancial de los polímeros no celulósicos de la pared de las Poáceas se mantienen unidos a las microfibrillas de celulosa por enlaces fenólicos (Carpita, 1983) (ver Figura 3).

Existen métodos probados de análisis químicos para evaluar la calidad de un alimento forrajero que podrían complementarse con otras determinaciones más precisas de análisis que redundarían en una caracterización química más detallada y un mejor aprovechamiento de las especies al momento de armar las raciones, es por esto que se decidió comparar dos metodologías de análisis de acuerdo a los siguientes objetivos:

## **II. Objetivos**

Observar la complementariedad y diferencias en dos métodos de análisis químicos para la determinación de compuestos de la pared celular de tallos de *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides*

- ❖ Comparar los resultados arrojados por los métodos de “laboratorio tradicionales”, %FDA y % Lig y “no tradicionales”, contenido de azúcares totales y contenido de ácidos urónicos para el análisis de composición química en alimentos para rumiantes.
- ❖ A partir de la comparación de los resultados, analizar el posible valor agregado de los métodos denominados “no tradicionales”.
- ❖ Caracterizar en forma preliminar la composición química de la pared celular de tallos de *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides* en distintos estadios del ciclo de crecimiento.
- ❖ Evaluar los cambios observados en los componentes de la pared celular vegetal en plantas pastoreadas a lo largo del ciclo de crecimiento de los cultivos de *Lotus tenuis* y *Botriocloa laguroides* en relación con plantas no pastoreadas.

## **III. Materiales y Métodos**

Las muestras provienen del lote 2 del establecimiento El Grillo, Partido de Tapalqué, provincia de Buenos Aires Ubicación satelital: 36° 34'18.9"S 60° 05'21.69" El pastizal natural de este establecimiento es representativo de la zona de Cuenca del Salado. En este establecimiento se realiza la cría de animales de la raza Aberdeen Angus.

Debido a que la calidad forrajera puede variar en el paisaje y a lo largo de la estación, se trabajó con tres jaulas colocadas en zonas de loma y media loma del potrero para la extracción de *B. laguroides* sin pastorear (ver Ilustración ). Las muestras pastoreadas se recolectaron de la zona circundante a las jaulas, también en tres

repeticiones. Se tomaron muestras en los meses de diciembre del 2010, enero, febrero y abril de 2011 ya que esta especie presenta un ciclo primavero-estivo-otoñal.



**Ilustración 1: Vista de dos jaulas loma para extracción de muestras *Botriocloa laguroides***

Respecto a *Lotus sp.*, se trabajó también con tres jaulas ubicadas en el bajo para la extracción de muestras sin pastorear. Las muestras pastoreadas se recolectaron de la zona circundante a las jaulas, también en tres repeticiones. Se tomaron muestras en noviembre y diciembre del año 2010 y enero, febrero y abril del 2011 debido a que también es una especie primavero estival y que en invierno entra en receso.

Cabe destacar que la primera toma de muestras debió atrasarse ya que no había crecimiento significativo de las plantas debido a una primavera con un período de seca marcado.



**Figura 4: *Lotus tenuis*: Bandeja de planta completa y muestra de tallo UCA LEAA Agrarias.**

El material una vez recolectado fue preservado en freezer hasta su manipuleo para la separación en tallo, hoja, lígula e inflorescencia en el caso de *Botriocloa laguroides* y hoja, tallo, flores y vainas en *Lotus tenuis* (ver Figura 4). Se realizó la determinación de MS a 65° hasta peso constante, luego las muestras fueron molidas en molino tipo Willey a 2mm. En ambas especies se trabajó sobre las muestras obtenidas de tallos. Debido a la escasa cantidad de material final obtenido se decidió armar pooles

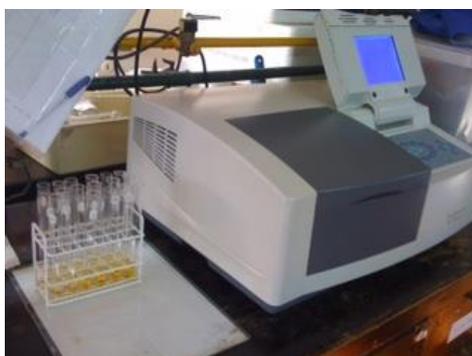
con las repeticiones obteniendo una muestra única para contar con material suficiente para realizar las determinaciones químicas.

Se realizó la determinación de FDA y Lig/FDA por el método de Van Soest (Ankom Technology).

Se realizó la determinación del contenido total de hidratos de carbono por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956), el contenido de ácidos urónicos por el método de Filisetti-Cozzi et al. (1991).



**Figura 5, 6 y 7: Preparación de muestras para las determinaciones de azúcares totales y ácidos urónicos FAUBA Laboratorio de Biomoléculas**



**Figura 8: Determinación de azúcares totales por UV FAUBA Laboratorio de Biomoléculas.**



**Figura 9: Determinación de ácidos urónicos por UV FAUBA Laboratorio de Biomoléculas.**

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por la metodología ANOVA, siguiendo un diseño factorial. Para las dos especies se utilizó el pastoreo y la fecha de cosecha como variables de clasificación siendo FDA, lignina, ácidos urónicos, y azúcares totales las variables respuesta. El número de réplicas fue de 2 en ambos casos con la salvedad de que las muestras no pastoreadas provienen todas de las mismas jaulas y tomando con rigurosidad el concepto estadístico de réplicas independientes, esto es un caso de pseudoreplicación.

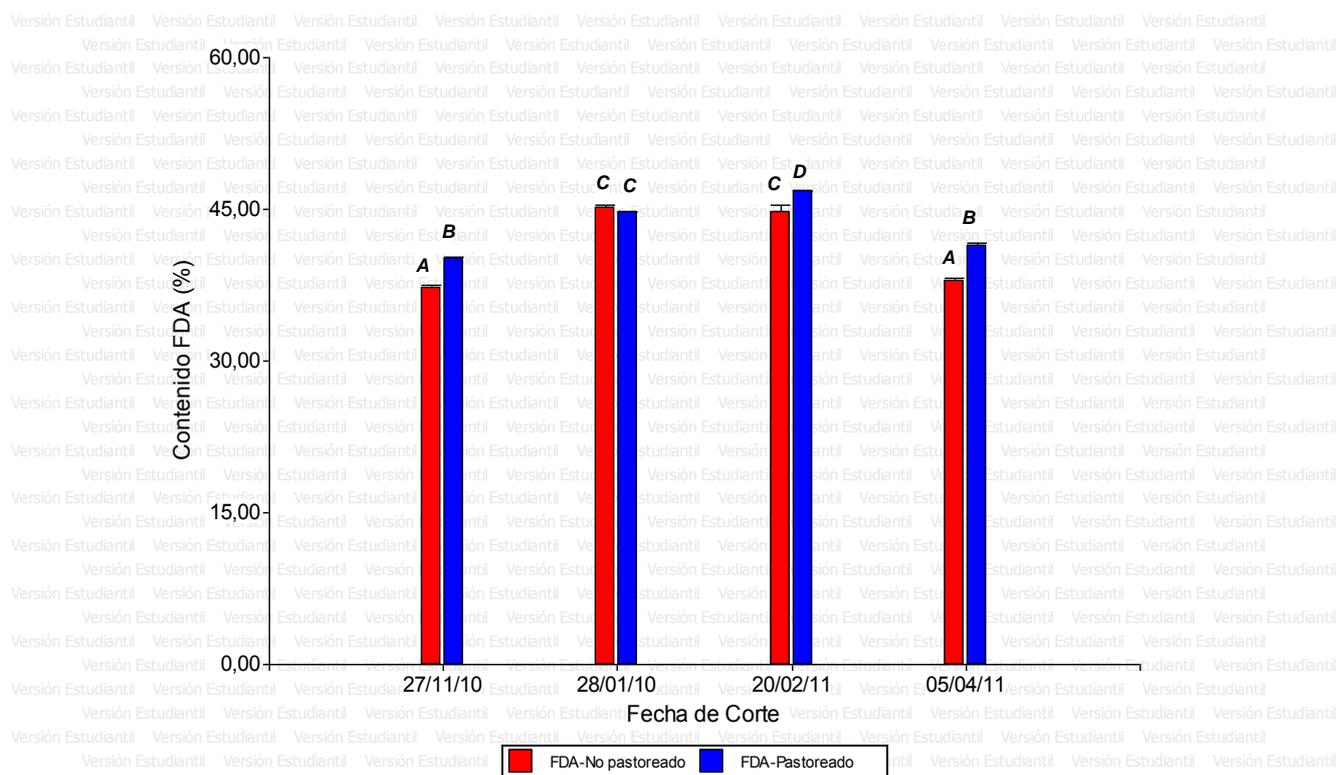
Se realizaron comparaciones múltiples a través del método de DGC y se comprobaron los supuestos de Homocedasticidad y Normalidad gráfica y analíticamente. Por último se realizó análisis de correlación entre las distintas variables respuesta como FDA y lignina, calculando los coeficientes  $r$  de Pearson. En todos los casos para concluir se utilizó un nivel de confianza de 0.95.

#### **IV. Resultados y Discusión**

##### **A. *Lotus tenuis***

El avance en la madurez de las especies forrajeras implica cambios graduales que tienden a disminuir la calidad del forraje final (mayor porcentaje de fibra con menor digestibilidad) y aumentar la cantidad de materia seca acumulada (Echeverría et al., 1986). La decisión del momento óptimo del pastoreo de las especies forrajeras tiene en cuenta estas dos variables para maximizar el aprovechamiento de lo pastoreado (cantidad y calidad de la materia seca pastoreada).

En este ensayo, *Lotus tenuis* no presentó incrementos marcados en el contenido de fibra ácida a nivel de tallo, ni de lignina, que permitan esperar un marcado descenso en la digestibilidad de los mismos. Esto se encuentra en concordancia con lo descrito por Criado (2014), Echeverría et al. (1986) y otros, en cuanto a la plasticidad que *Lotus tenuis* presenta para su aprovechamiento, dado que el transcurso del tiempo no disminuiría la digestibilidad de sus tejidos. Este sostenimiento en la digestibilidad de la pared celular de *Lotus tenuis* marca una diferencia con los resultados obtenidos por numerosos autores como Jung et al. (1995), Jung (2012), Buxton (1996), McDonald et al. (2002), quienes encontraron el típico descenso en la digestibilidad de la pared celular en leguminosas conforme el avance del ciclo de vida.



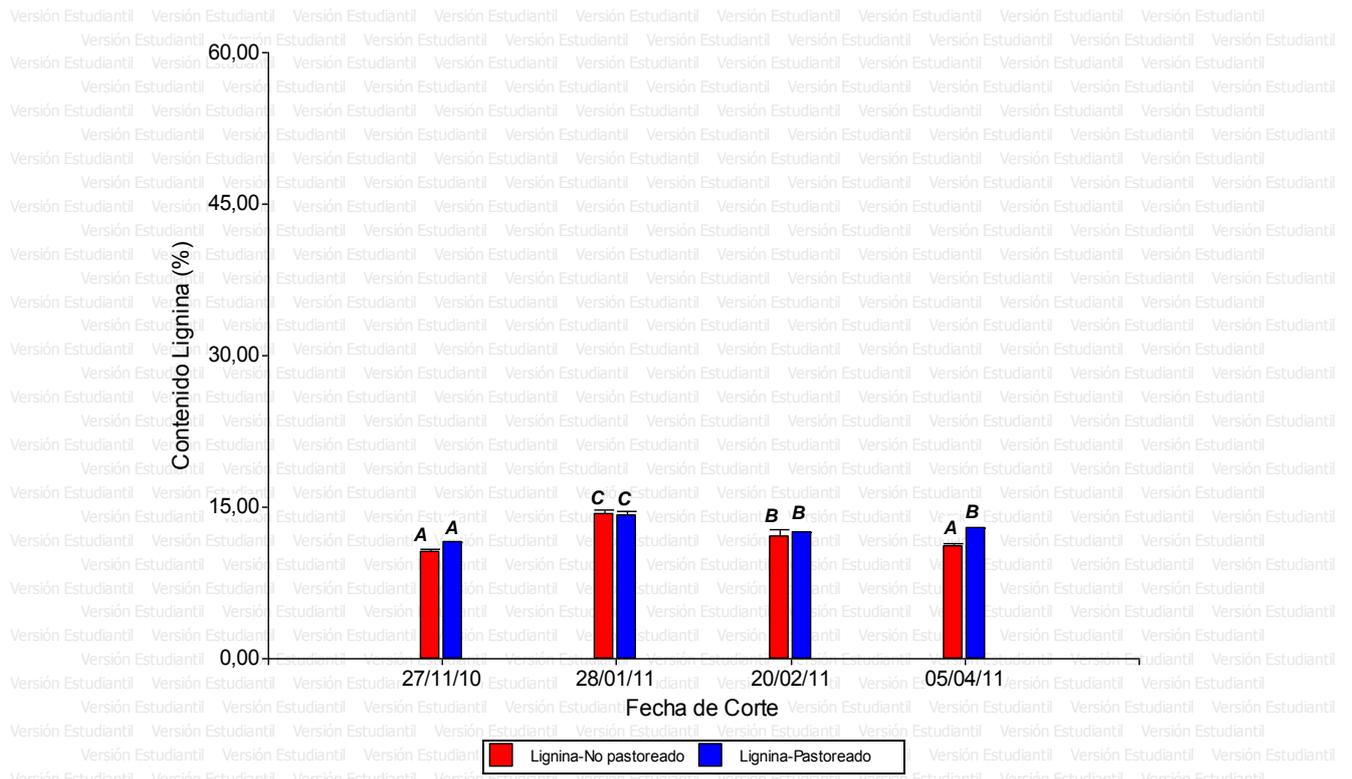
**Gráfico 1: Contenido de FDA según Fecha y Tratamiento - *Lotus tenuis***

Se observó que a medida que la planta “envejece” o avanza en su ciclo ontogénico, el contenido de FDA aumenta en los primeros tres cortes, al igual que el porcentaje de celulosa, disminuyendo ambos parámetros en el corte de abril, posiblemente debido al rebrote de esta especie que se produce en otoño. Similares resultados fueron obtenidos por Echeverría et al. (1986) (ver Gráfico 1).

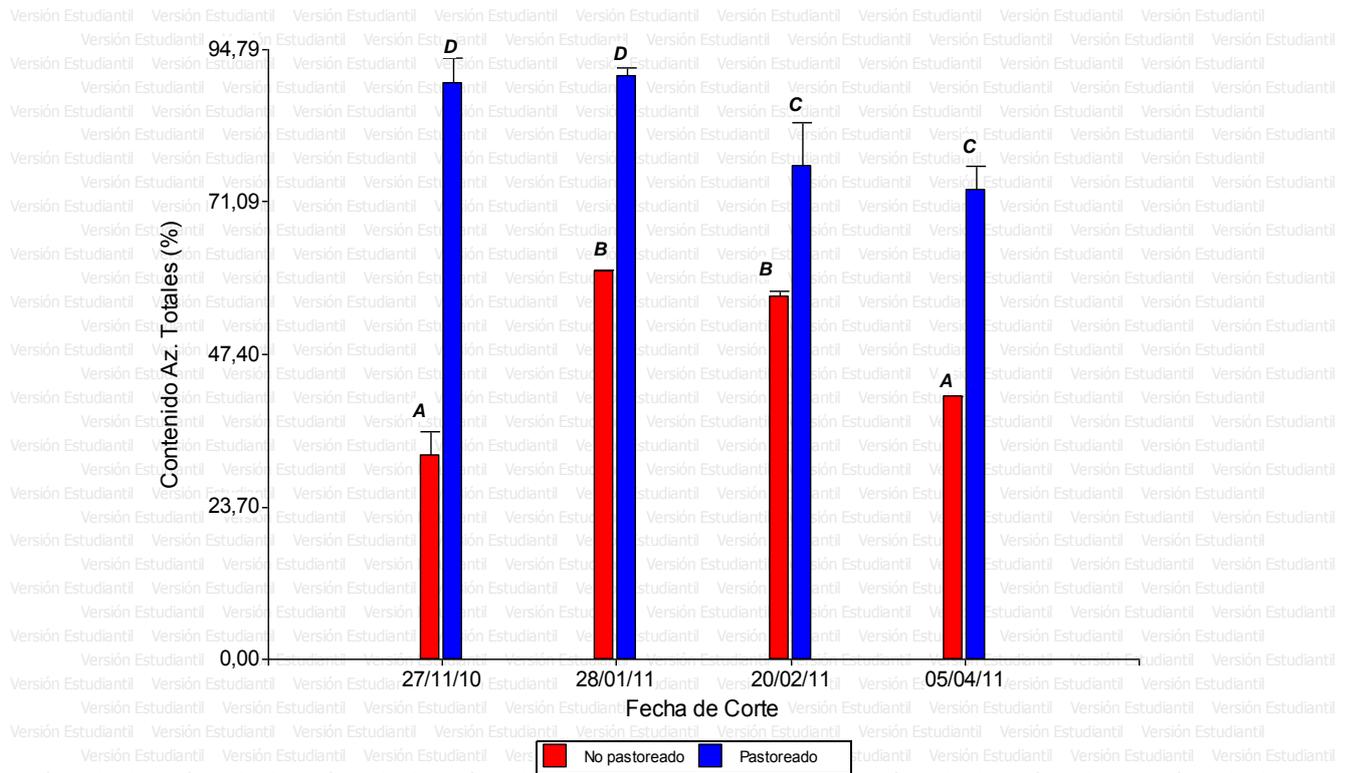
El contenido de lignina aumentó entre el primero y segundo corte en forma mas marcada y luego descendió ligeramente en el corte de febrero y abril, sin grandes variaciones (ver Gráfico 2).

Respecto al porcentaje de azúcares totales medidos a nivel de pared celular, es interesante observar que hubo un comportamiento distinto a lo largo del ciclo entre las plantas pastoreadas y las no pastoreadas. Se observó un aumento en las plantas no pastoreadas del primero al segundo corte, el valor se mantuvo en el tercer corte y luego una pequeña disminución entre el tercero y cuarto corte. En las plantas pastoreadas en cambio el porcentaje de azúcares totales fue más elevado en los primeros dos cortes y luego disminuyó en el tercer corte y se mantuvo en el cuarto corte (ver Gráfico 3).

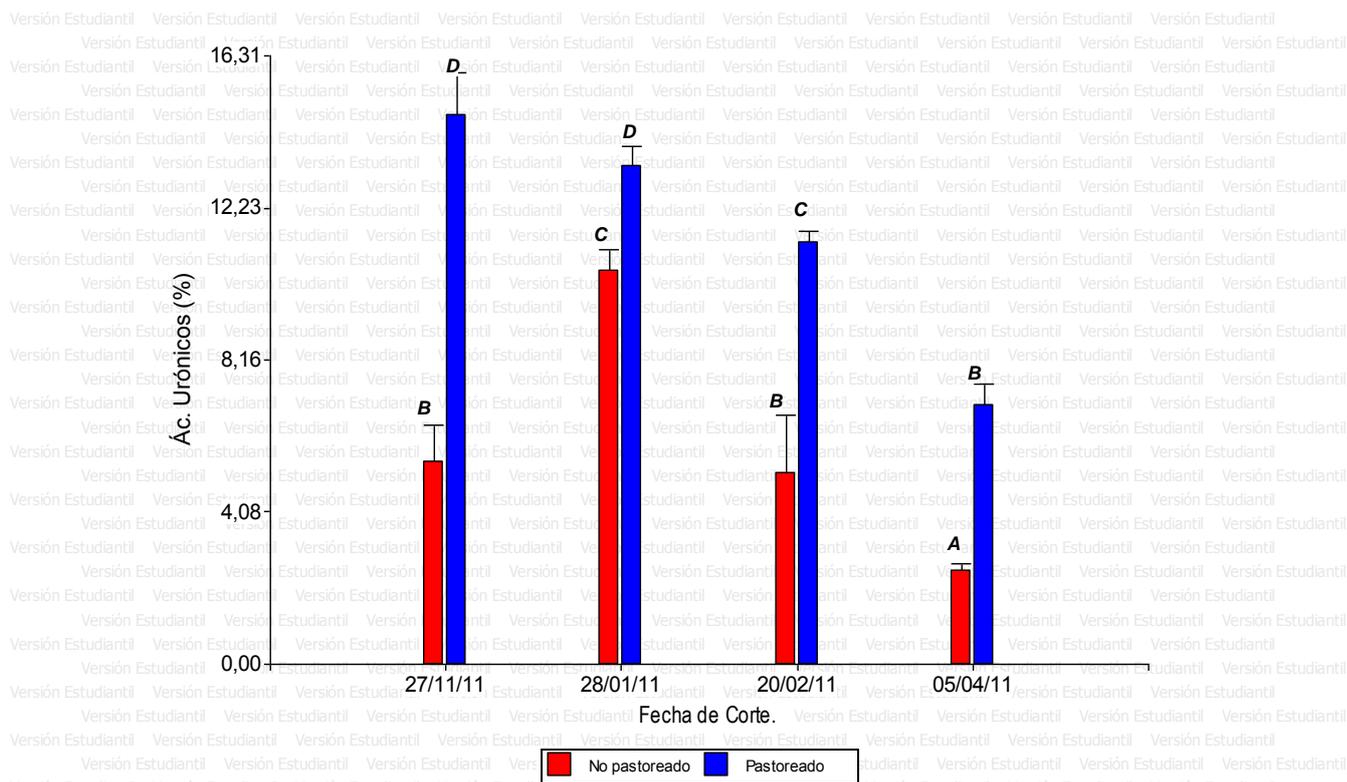
Respecto al porcentaje de ácidos urónicos medidos a nivel de pared celular, también se observó un comportamiento distinto entre pastoreadas y no pastoreadas. El porcentaje de ácidos urónicos en las plantas no pastoreadas aumentó entre el primer y segundo corte, y luego fue disminuyendo en el resto de los cortes. En cambio en las muestras pastoreadas, los valores más altos se encontraron en los dos primeros cortes y luego disminuyeron en el tercero y cuarto (ver figura 4).



**Gráfico 2: Contenido de Lignina según Fecha y Tratamiento - *Lotus tenuis***



**Gráfico 3: Contenido de Az. totales según Fecha y Tratamiento - *Lotus tenuis***



**Gráfico 4: Contenido de Ác. urónicos según Fecha y Tratamiento - *Lotus tenuis***

La dinámica general de la variación en la composición química de *Lotus tenuis* encontrada en este estudio se condice con la de Echeverría et al. (1986), que describe para la mayoría de los parámetros una variación curvilínea caracterizada por un leve descenso de la digestibilidad en los primeros 130 días del ciclo para luego estabilizarse y ascender levemente.

Respecto a la variable pastoreado versus no pastoreado, se observó en casi todos los parámetros evaluados, salvo lignina, que las plantas no pastoreadas tuvieron valores menores que las pastoreadas, en particular, menor contenido de FDA, celulosa, azúcares totales y ácidos urónicos, con la excepción de FDA y celulosa para la fecha 28/1.

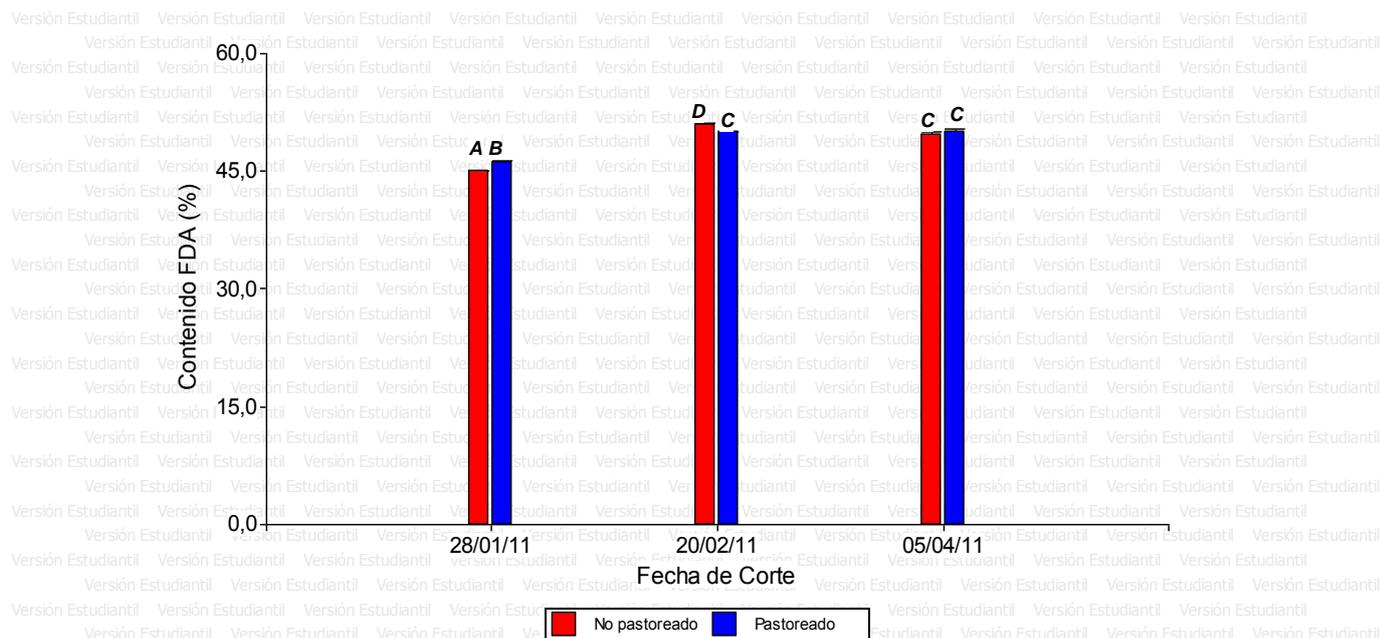
Esta diferencia encontrada respecto al contenido de azúcares totales a nivel de pared celular entre las muestras no pastoreadas y las pastoreadas y, en forma más específica, la diferencia encontrada en el porcentaje de ácidos urónicos, podría estar relacionada con un mayor contenido de pectinas en las plantas pastoreadas. Mcneil et al. (1984) indica que las pectinas sirven como moléculas de reconocimiento que señalan el desarrollo de respuestas adecuadas a organismos simbióticos, patógenos e insectos. Es posible inferir que el mayor contenido de pectinas en muestras pastoreadas sea una respuesta característica de las plantas.

El análisis de correlación a través del cálculo del coeficiente de Pearson para las distintas variables medidas en *Lotus tenuis* no arrojó resultados de relevancia en ninguna de las combinaciones (ver anexo I).

## **B. *Botriocloa laguroides***

La evaluación del contenido de FDA para *Botriocloa laguroides* muestra que las plantas pastoreadas tuvieron mayores valores que las no pastoreadas para el primer corte, sucediendo lo inverso en el segundo corte. Finalmente el corte otoñal no mostró

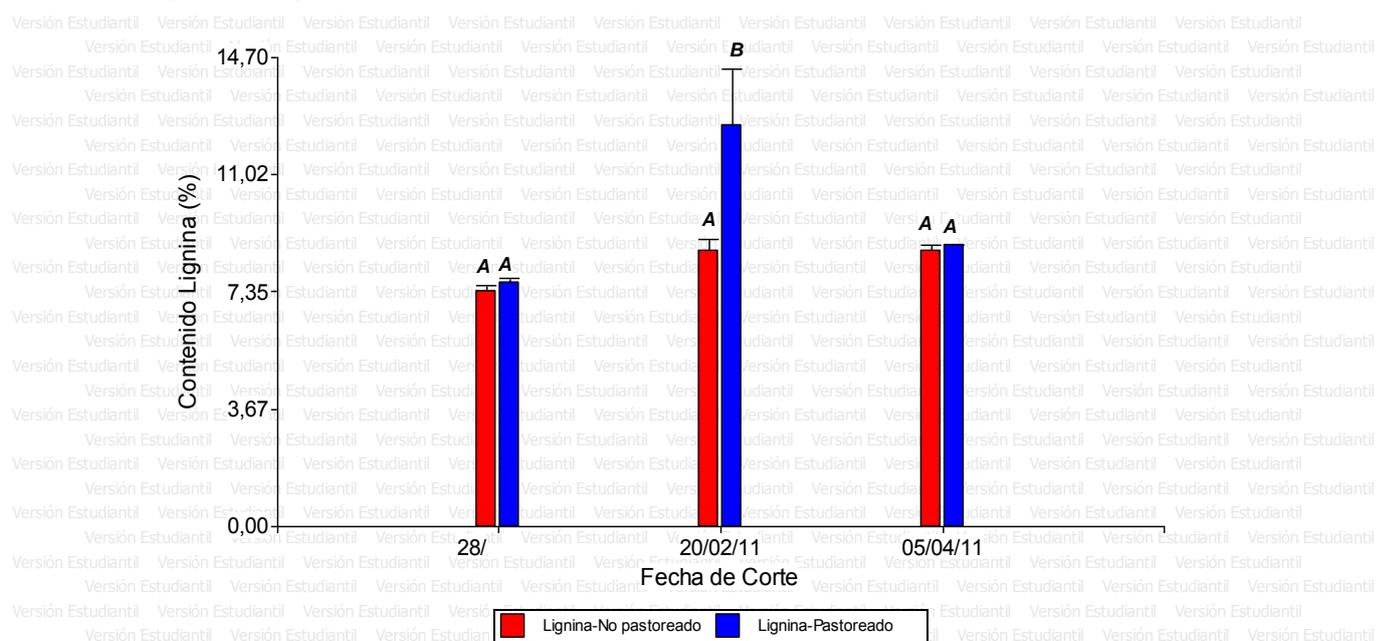
diferencias significativas en el contenido de FDA según la condición de pastoreo (ver Gráfico 5).



**Gráfico 5: Contenido de FDA según Fecha y Tratamiento - *Botriocloa laguroides***

Por su parte, la tendencia según el ciclo ontogénico pareciera ser el incremento del porcentaje de FDA entre el primer y el segundo corte para luego disminuir (plantas no pastoreadas) o mantenerse estable (plantas pastoreadas). El incremento en la importancia relativa de la fracción fibra de las Poáceas a través de su ciclo de vida ha sido reportada por autores como Aman (1993) y McDonald et al. (2002) (ver Gráfico 6).

Al igual que en *Lotus tenuis*, la presencia de rebrotes en el último corte podría ser la explicación para la variación observada.

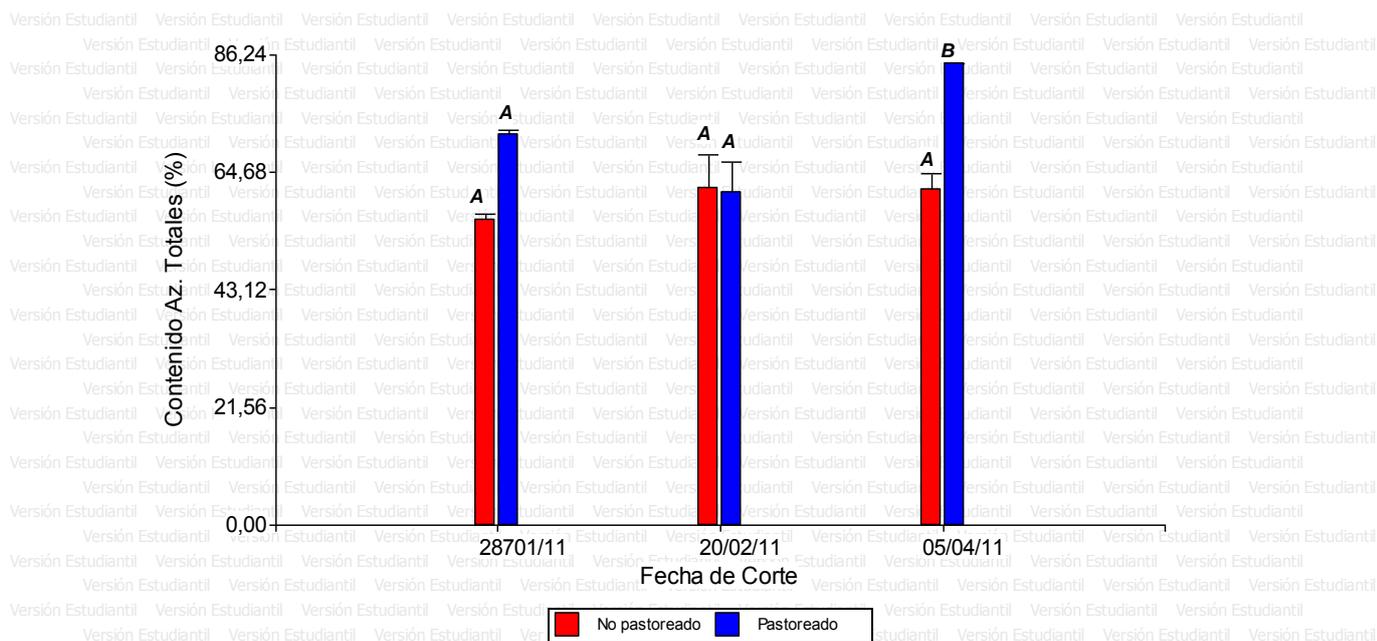


**Gráfico 6: Contenido de Lignina según Fecha y Tratamiento - *Botriocloa laguroides***

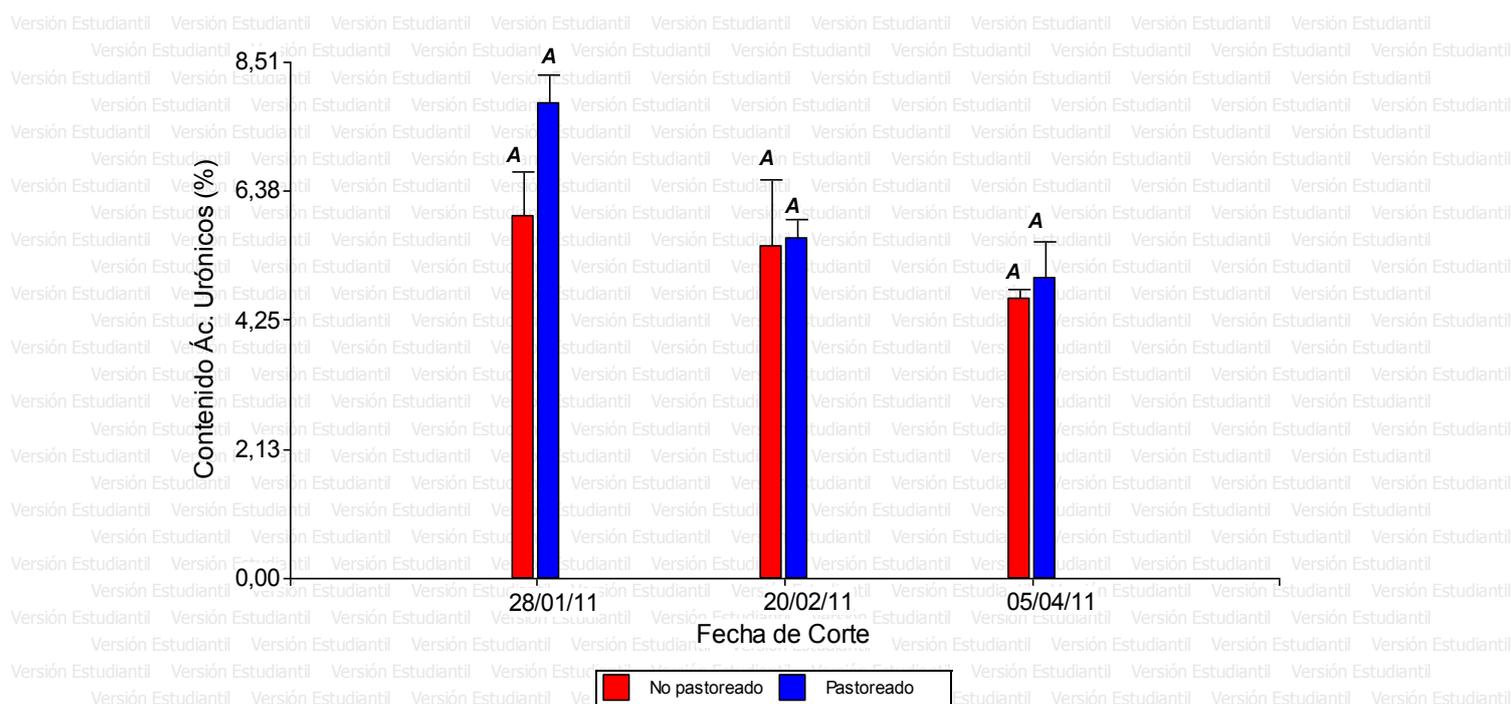
No se observaron variaciones de significancia en el contenido de lignina en la pared celular de *Botriocloa laguroides* a través de las distintas fechas de corte, así como tampoco tendencias contundentes en función del pastoreo. Esto coincide con lo señalado por Aman (1993) respecto a la escasa lignificación de las Poáceas.

El porcentaje de lignina en *Botriocloa laguroides* fue inferior al de *Lotus tenuis* para todas las fechas de corte y condiciones de pastoreo. Se encuentra ampliamente aceptado que el contenido de lignina de las Poáceas es inferior al de las Leguminosas (McDonald et al., 2002).

Tanto el contenido de azúcares totales, como el de ácidos urónicos se mostraron constantes a través del ciclo de vida de las plantas pastoreadas como de las no pastoreadas en *Botriocloa laguroides*.



**Gráfico 7: Contenido de Az. totales según Fecha y Tratamiento - *Botriocloa laguroides***



**Gráfico 8: Contenido de Ác. urónicos según Fecha y Tratamiento - *Botriocloa laguroides***

Comparando los contenidos de ácidos urónicos de *Botriocloa laguroides* con los de *Lotus tenuis*, se observa un mayor contenido porcentual de los mismos en *Lotus* versus *Botriocloa*. Como ya se ha señalado, la presencia de ácidos urónicos en la pared celular vegetal se explica por ser componentes principales de las pectinas. Aman, 1993 ha señalado el mayor contenido de pectinas y, por ende, de ácidos urónicos, de las plantas leguminosas respecto de las Poáceas.

El análisis de correlación a través del cálculo del coeficiente de Pearson para las distintas variables medidas en *Lotus tenuis* no arrojó resultados de relevancia en ninguna de las combinaciones (ver anexo II).

## V. Conclusiones

Existen diferentes métodos químicos que pueden utilizarse para la determinación de los compuestos de la pared celular de especies forrajeras. En función de los resultados obtenidos se procede luego al armado de raciones para lograr la adecuada alimentación de los animales en pastoreo.

Con el avance de las investigaciones se observó que las paredes celulares de las pasturas forrajeras se comportan como una matriz dinámica con gran variedad de respuestas frente a estreses que implican cambios en su composición y estos cambios podrían afectar tanto al consumo voluntario como a la digestibilidad posterior de esas plantas al ser consumidas por un rumiante. *Lotus tenuis* es una especie forrajera que muestra la virtud de mantener altos valores de digestibilidad de los componentes de su pared celular a través de las distintas etapas de su ciclo de vida. Esta es una característica de suma importancia, ya que constituye un factor de plasticidad a la hora de diseñar su manejo en sistemas de producción extensivos.

Luego del pastoreo, las especies forrajeras rebrotan y en general, se observa un aumento en la digestibilidad de esos nuevos tejidos vegetales, que se evidencian por un menor contenido de %FDA, menor % de lignina y de celulosa, acompañado por un % de proteína bruta más elevado. Asimismo, las muestras no pastoreadas suelen tener un mayor contenido de material vegetal senescente, mientras que en las muestras pastoreadas estos tejidos han sido removidos por la herbivoría.

En este ensayo la utilización de metodologías más específicas como la determinación de azúcares totales y la de ácidos urónicos permitieron que se pudieran evidenciar muy significativos cambios debidos al pastoreo respecto a esos parámetros a nivel de pared celular que con las determinaciones tradicionales de %FDA y % lignina no se advertían y pudieran tener efecto en el aprovechamiento posterior que hace el rumiante de esa especie. El marcado incremento en el contenido de ácidos urónicos que se relacionan con la presencia de pectinas va acompañado de un aumento aun mayor en el porcentaje de azúcares totales en las muestras pastoreadas, esto podría deberse en gran medida a las largas cadenas laterales de arabinogalactanos unidas a los esqueletos de algunos de estos polisacáridos ricos en ácidos urónicos.

Debiera continuarse con los análisis de estas muestras evaluando el contenido en % de fibra detergente neutro (%FDN), el % de proteína bruta y la digestibilidad *in vitro* para profundizar en su composición química y en su posible efecto posterior en pastoreo.

En el caso de *Botriocloa laguroides*, los resultados se complementan pero no brindan mayor información o indican diferencias entre las mediciones de %FDA y % de lignina

respecto a los valores de % de azúcares totales y ácidos urónicos. La menor variación en ácidos urónicos puede explicarse debido al menor contenido de pectinas que caracteriza a las Poáceas. Para esta especie sería interesante determinar las digestibilidad *in vitro* para el corte de otoño debido a la diferencia encontrada en el contenido de azúcares y observar si estas tendencias se presentan también en hojas.

## VI. Bibliografía

- Ausubel, F.M. (2005) Are innate immune signalling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunol.* 6, 973-979
- Aman, P. and Graham, H. 1990. Chemical evaluation of polysaccharides in animal feeds. p. 161-177. In J. Wiseman and D. J. Cole (ed.) *Feedstuff evaluation*. Butterwoths, London.
- Balbi, V. and Devoto, A. (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* 177, 301–318
- Brett, C. and Waldron, K. (1990). *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Unwin Hyman.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* 60: 183–205
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland USA. 1367 pp. 2000.
- Buxton, D.R., Casler, M.D. Environmental and genetic effects on cell wall composition and digestibility, P. 685-714 In: *Forage cell wall Structure and digestibility*. 1993 ASA-CSSA-SSSA, 677 Madison, WI 53711, USA
- Carpita, N. C. (1983). Hemicellulosic polymers of cell walls of *Zea coleoptiles*. *Plant Physiol.* 72,515-521.
- Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3(1), 1-30.
- Carrillo, J. (2003). *Manejo de Pasturas*. INTA.
- Ciancia M, Quintana I, Vizcargüénaga MI, Kasulin L, de Dios A, Estevez JM, Cerezo AS (2007) Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis, *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 641-649.
- Criado, Carlos Alberto (2014). Lotus "Pampa"INTA Una herramienta de trabajo para los suelos bajos-inundables. EEA Cuenca del Salado, Publicación Técnica.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathohens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833 .
- Deregibus, V.A. y Soriano, A, (1981) los pastizales de la zona de cría de la Depresión del Salado desde el punto de vista ecológico. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 1 (2):60-83.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Echeverría D. Delia, Wernli K. Claudio, Cosio G. Fernando (1986) Características nutricionales de una pradera de lotera de hoja angosta (*Lotus tenuis* Wald et Kit). II. Variación en la calidad de las plantas en el tiempo. *Agricultura Técnica (Chile)* 46 (3): 245 – 252.

- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., Turner, J.G. (2002). The arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14: 1557–1566.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita & N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.
- Graham, H., Aman, P. and Petterson D. (1990). Chemical analysis and nutritional aspects of dietary fibres. *Comp. Physiol.* 5:242-253.
- Gidenne, T. and Lebas, F. (2002). Role of dietary fibre in rabbit nutrition and in digestive troubles prevention. INRA, Centre de Recherche de Toulouse. BP 27, 31326.
- Hoffmann-Campo, C., Harborne, J., McAffery, A. (2001). Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98:181–19
- Howe, G., and Jander, G. (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41-66.
- Jarvis, M.C. (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies *Food Hydrocolloids* 25: 257-262
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. The plant immune system Vol 444/16 November 2006/dol:10.1038/nature05286 Nature Publishing Group
- Jung, H.G. (2012). Forage Digestibility: The intersection of cell Wall lignification and Plant Tissue Anatomy. Dept. of Agronomy and Plant Genetics, Dept. of Animal Science, University of Minnesota.
- Jung, H.G. and Allen, M. S. (1995). Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* 73:2774-2790.
- Jung, H.G. and Vogel, K. P. (1986). Influence of Lignin on Digestibility of Forage Cell Wall Material. *Journal of Animal Science* 62:1703-1712.
- Kato, Y. and Nevins, D. J. (1985). Isolation and identification of O-(5-Oferuloil-alfa-L-arabinosil)-(1-3)-O-beta-D-xylopiranosil-(1-4)-D-xilopiranososa as a component of Zea shoot cell walls. *Carbohydr. Res.* 137, 139-150.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhelgh, J.F.D. and Morgan, C.A. (2002). *Animal Nutrition*, 6<sup>o</sup> edition. Prentice Hall, Pearson Education, Edinburgh Gate.
- McNeill, M., Darvill, A.G., Fry, S. C. and Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
- Mertens, D.R., 1980. Fiber contents and nutrient density in dairy rations. *Proc. Distillers Feed Conference*. Pág. 37.
- Mertens, D.R., 1994. Regulation of forage intake. G.C. Fahey, Jr. et al. (Editors), *Forage quality, evaluation and utilization*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pág. 450-493
- Morrison IM 1988. Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochem* 27: 1097-1100.
- Neupane, F., Norris, D. (1990). Iodoacetic acid alteration of soybean resistance to the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 19:215–221.
- Sharma, H., Norris, D. (1991). Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 55:353–364.
- Shea, E. M., Gibeaut, D. M., Carpita, N. C. (1989). Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta*, 179, 293-308.

- Smith, L. W., H. K. Goering, and C. H. Gordon. 1972. Relationships of forage composition with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. *J. Dairy Sci.* 55:1140.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* Vol 306: 2206-2271
- Titgemeyer, E. C., Cochran, R. C., Towne, E. G., Armendariz, C. K. and Olson, K. C. (1996). Elucidation of factors associated with the maturity-related decline in degradability of big bluestem cell wall. *Journal of Animal Science* 74:648-657.
- Van Soest, P.J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant 2<sup>nd</sup>. edition Comstock Publishing Associates Cornell University Press Ithaca NY
- Veneciano, J.H., Frigerio, K.L. y Frasinelli, C.A. (2004). Acumulación de forrajimasa e indicadores de calidad de gramíneas perennes estivales fertilizadas. *Rev. Fac. Agronomía – UNLPam* Vol. 15 N°1/2
- Vignolio, O.R., Fernández, O.N. (2006). Bioecología de *Lotus glaber* Mill. (Fabaceae) en la Pampa Deprimida (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista Argentina de Producción Animal* 26: 113-130.
- Zavala, J.A., Patankar, A.G., Gase, K., and Baldwin, I.T. (2004a). Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:1607-1612
- Zavala, J.A., Patankar A.P., Gase K., Hui D. & Baldwin I.T. (2004) Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as anti-herbivore defenses. *Plant Physiol*, 134: 1181-1190.
- Zavala, J.A., and Baldwin, I.T. (2006). Jasmonate signaling constraints regrowth in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell and Environment*, 29: 1751-1760
- Zavala, J.A., Casteel, C.L., Berenbaum, M.R. and De Lucia, E.H. (2008) Anthropogenic increases in carbon dioxide promote damage by invasive insects by compromising plant defenses. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 5129-5133

## VII. Anexo I: Tablas de Resultados Estadísticos – *Lotus tenuis*

### FDA

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,4990**

Error: 0,2165 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	41,24	8	0,16	A
Pastoreado	43,26	8	0,16	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,2170**

Error: 0,2165 gl: 8

Fecha Codif.	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	No pastoreado	37,24	2	0,33	A
4	No pastoreado	37,93	2	0,33	A
1	Pastoreado	40,21	2	0,33	B
4	Pastoreado	41,34	2	0,33	B
3	No pastoreado	44,68	2	0,33	C
2	Pastoreado	44,73	2	0,33	C
2	No pastoreado	45,12	2	0,33	C
3	Pastoreado	46,78	2	0,33	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### LIGNINA

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,5090**

Error: 0,2252 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	12,01	8	0,17	A
Pastoreado	12,80	8	0,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,2414**

Error: 0,2252 gl: 8

Fecha Codif.	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	No pastoreado	10,52	2	0,34	A
4	No pastoreado	11,07	2	0,34	A
1	Pastoreado	11,54	2	0,34	A
3	No pastoreado	12,10	2	0,34	B
3	Pastoreado	12,53	2	0,34	B
4	Pastoreado	12,95	2	0,34	B
2	Pastoreado	14,20	2	0,34	C
2	No pastoreado	14,36	2	0,34	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### AZÚCARES TOTALES

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=5,1368**

Error: 22,9443 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	47,30	8	1,69	A
Pastoreado	82,43	8	1,69	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=12,5287**

Error: 22,9443 gl: 8

Fecha Codif.	Tratamiento	Medias	n	E.E.
--------------	-------------	--------	---	------

1	No pastoreado	31,76	2	3,39	A			
4	No pastoreado	40,75	2	3,39	A			
3	No pastoreado	56,34	2	3,39		B		
2	No pastoreado	60,34	2	3,39		B		
4	Pastoreado	72,92	2	3,39			C	
3	Pastoreado	76,61	2	3,39			C	
1	Pastoreado	89,49	2	3,39				D
2	Pastoreado	90,72	2	3,39				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### ÁCIDOS URÓNICOS

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,2652

Error: 1,3920 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	5,91	8	0,42	A
Pastoreado	11,58	8	0,42	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=3,0859

Error: 1,3920 gl: 8

Fecha Codif.	Tratamiento	Medias	n	E.E.				
4	No pastoreado	2,52	2	0,83	A			
3	No pastoreado	5,14	2	0,83		B		
1	No pastoreado	5,41	2	0,83		B		
4	Pastoreado	6,95	2	0,83		B		
2	No pastoreado	10,56	2	0,83			C	
3	Pastoreado	11,30	2	0,83			C	
2	Pastoreado	13,35	2	0,83				D
1	Pastoreado	14,73	2	0,83				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

Fecha Codif.	FDA	Lignina	Az. Totales	Ác. Urónicos	
Fecha Codif.	1,000	0,318	0,383	0,856	0,077
FDA	0,266	1,000	0,001	0,029	0,074
Lignina	0,234	0,740	1,000	0,032	0,066
Az. Totales	-0,049	0,544	0,537	1,000	8,3E-05
Ác. Urónicos	-0,455	0,458	0,470	0,825	1,000

## VIII. Anexo II: Tablas de Resultados Estadísticos – *Botriocloa laguroides*

### FDA

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,4515**

Error: 0,1232 gl: 6

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	48,53	6	0,14	A
Pastoreado	48,67	6	0,14	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,9863**

Error: 0,1232 gl: 6

Fecha codif	Tratamiento	Medias	n	E.E.			
1	No pastoreado	44,96	2	0,25	A		
1	Pastoreado	46,11	2	0,25		B	
3	No pastoreado	49,71	2	0,25			C
3	Pastoreado	49,94	2	0,25			C
2	Pastoreado	49,96	2	0,25			C
2	No pastoreado	50,91	2	0,25			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### LIGNINA

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,3650**

Error: 1,1260 gl: 6

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	8,22	6	0,43	A
Pastoreado	9,69	6	0,43	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,9818**

Error: 1,1260 gl: 6

Fecha codif	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	No pastoreado	7,36	2	0,75	A
1	Pastoreado	7,67	2	0,75	A
3	No pastoreado	8,65	2	0,75	A
2	No pastoreado	8,65	2	0,75	A
3	Pastoreado	8,82	2	0,75	A
2	Pastoreado	12,58	2	0,75	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### AZÚCARES TOTALES

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=6,6625**

Error: 26,8231 gl: 6

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	59,75	6	2,11	A
Pastoreado	72,44	6	2,11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=14,5535**

Error: 26,8231 gl: 6

Fecha codif	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	No pastoreado	55,99	2	3,66	A
2	Pastoreado	61,13	2	3,66	A
3	No pastoreado	61,44	2	3,66	A

2	No pastoreado	61,81	2	3,66	A
1	Pastoreado	71,62	2	3,66	A
3	Pastoreado	84,57	2	3,66	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### ÁCIDOS URÓNICOS

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,1622

Error: 0,8162 gl: 6

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
No pastoreado	5,36	6	0,37	A
Pastoreado	6,13	6	0,37	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,5388

Error: 0,8162 gl: 6

Fecha codif	Tratamiento	Medias	n	E.E.	
3	No pastoreado	4,61	2	0,64	A
3	Pastoreado	4,94	2	0,64	A
2	No pastoreado	5,48	2	0,64	A
2	Pastoreado	5,60	2	0,64	A
1	No pastoreado	5,98	2	0,64	A
1	Pastoreado	7,84	2	0,64	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

Fecha codif	FDA	Lignina	Az. Totales	Ác. Urónicos	
Fecha codif	1,000	0,003	0,402	0,237	0,009
FDA	0,783	1,000	0,099	0,533	0,069
Lignina	0,267	0,499	1,000	0,936	0,662
Az. Totales	0,370	0,200	0,026	1,000	0,651
Ác. Urónicos	-0,714	-0,542	-0,141	0,146	1,000