

EL RESGUARDO DEL SUELO
SE TRANSFORMÓ
EN EL RETO DEL SIGLO

ENTREVISTA A JUAN BALBÍN
"EL MACS G20 ES UNA VIDRIERA
PARA EL AGRO ARGENTINO"

ALIMENTOS: el consumo responsable trastoca paradigmas





ISSN 0325-8718
ISSN 1669-2314

Institución Editora:
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Cuatrimestral

Vol. 44 N.º 1
Abril 2018, Buenos Aires, Argentina

Propiedad Intelectual
Propiedad Intelectual N.º 5231354

SEDE EDITORIAL

Chile 460 2.º piso
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
CP (C1098AAJ)
+54 (011) 4339-0600
<http://ria.inta.gov.ar>
revista.ria@inta.gov.ar

La Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA) es una publicación de información científica editada por el INTA. Los artículos presentados son admitidos por un Comité Editorial compuesto por prestigiosas figuras del ámbito académico y científico agropecuario. Abarca diferentes temas preparados por profesionales del INTA y de otras instituciones, y está destinada a la comunidad científica nacional e internacional.

Reservados todos los derechos. Prohibida su reproducción sin autorización expresa de sus editores, en cuyo caso se agradecerá citar la fuente.

Lo expresado por autores, corresponsales o columnistas no necesariamente reflejan el pensamiento del Comité Editorial, de la revista o de su institución editora.

Indexada en:
Scopus
Latindex (Folio 3346)
CABI Publishing
DOAJ (Directory of Open Access Journals)
Redalyc.org
Núcleo Básico
Thomson Reuters
Dialnet
Scielo
CiteFactor

MIEMBROS DEL CONSEJO DIRECTIVO DEL INTA

Presidente:

Ing. Agr. Juan Balbín

Vicepresidente:

Ing. Mariano Miguel Bosch

Consejeros Nacionales:

Med. Vet. Carlos Alberto Antonio Vera - MinAgro
Ing. Agr. Oscar Arellano - Facultades de Agronomía
Ing. Agr. Horacio Abel Alippe - AACREA
Ing. Agr. Elbio Néstor Laucirica - CONINAGRO
Sr. Alejandro Lahitte - CRA
Dr. Pablo Paillole - FAA
Sr. Carlos Vila Moret - SRA
Dr. Carlos A. Arzone - Facultad de Veterinaria

Director Nacional:

Ing. Agr. Héctor Espina

Directores Nacionales Asistentes:

DNA Sistemas de Información, Comunicación y Calidad
Lic. Juan Manuel Fernández Arocena

DNA de Relaciones Institucionales
Dra. Ana Cipolla

DNA Planificación, Seguimiento y Evaluación
Dra. Susana Mirassou

DNA Organización y RR.HH.
Dra. Hebe Julián

DNA Administración CPN
Lic. Rosendo Tarsetti

Coordinadores Nacionales:

CN de Transferencia y Extensión
Ing. Ftal. Diego Ramilo

CN de Investigación y Desarrollo
Dr. Fernando Fernández

CN de Vinculación Tecnológica
Ing. Adolfo Luis Cerioni

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Dr. Carlos Di Bella. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

Vocales:

Ing. Agr. Jorge Mariotti. Universidad Nacional de Salta (UNSA). Argentina
Dra. Ana María Romero. Universidad de Buenos Aires (UBA). Argentina
Ing. Agr. M. Sc. María Eugenia Beget. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina
Dr. Miguel Ángel Taboada. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina
Dr. Laureano S. Frizzo. Universidad Nacional del Litoral (UNL).

Dra. Cecilia Gargano. Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

Dr. Frédéric Goulet. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). Francia

Dr. Martín Durante. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Dr. Ariel Pereda. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

COMITÉ ASESOR

Ing. Agr. M.Sc. Marina Di Filippo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Dr. Emiliano Quiroga. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Dr. Darío Fernández. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Ing. Agr. M.Sc. Alejandro Rago. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Lic. María Isabel Tort. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Dra. Karina Trono. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

Ing. Agr. Sergio E. Feingold. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

STAFF

Dirección:

Dra. Norma Pensel
Lic. Máximo Bontempo

Coordinación editorial:

Per. Giselle Miquet
Mg. Mario Migliorati

Asistente editorial:

Lic. Gustavo Ciuffo

Producción Editorial:

Asesores técnicos y de contenido:
Ing. Agr. Cristian Zuchini
Dr. Martín Irurueta

Diseño y Edición:

Comunicación Visual, Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional

Fotografía:

Audiovisual, Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional

Esta publicación es propiedad del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Rivadavia 1439. CABA. Buenos Aires, Argentina.



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Atender las nuevas tendencias del consumo de alimentos

En las últimas dos décadas el interés de los consumidores por los alimentos comenzó a cambiar. El enfoque actual contempla la inocuidad, el valor nutricional, los atributos sensoriales y el precio de los mismos e integra, además, otros factores como son los aspectos éticos de la producción de alimentos (preocupación por el medio ambiente, el bienestar animal, el origen y la transparencia en la cadena de valor) así como la salud y la conveniencia.

De pensarse en lo que se pierde o se desperdicia cada año, hay que contabilizar alrededor de unas 1.300 millones de toneladas, es decir, un tercio de los alimentos que se producen en el mundo. En general, en las naciones industrializadas se desperdician muchos más alimentos *per cápita* que en los países en desarrollo.

A nivel global, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, según sus siglas en inglés), apoya actualmente a unos 50 países en el ámbito de las pérdidas y el desperdicio de alimentos y reconoce que la asociación innovadora para hacer frente a este problema abarca a la cadena de valor, desde el campo hasta la mesa.

En estos acuerdos, también se piensa a nivel del consumidor. Se lo considera otra de las causas que originan el desperdicio de alimentos, relacionado con la falta o poca planificación a la hora de hacer las compras, considerar las fechas de consumo y desechar comidas evitables. En la promoción de políticas destinadas a reducir las pérdidas y desperdicios se requieren más iniciativas que alienten a los consumidores a planificar como a estimular comportamientos de adopción y cambios a dietas nutritivas y seguras, con una menor huella ambiental.

En su condición de integrante del sistema científico y tecnológico nacional, el INTA atiende estas nuevas tendencias del consumo de alimentos, las cuales presentan importantes desafíos a la industria y al sector vinculado a la ciencia y tecnología de los alimentos y bebidas.

El INTA ha consolidado líneas de investigación vinculadas a la inocuidad de los alimentos mediante estudios de prevalencia y caracterización de los principales patógenos de interés en esta rama, como también en la aplicación de estrategias de intervención para el control de los mismos.

Con relación a la inocuidad, trabaja en la identificación, cuantificación y estudios de disipación de micotoxinas, productos fitosanitarios, alcaloides y fármacos de uso veterinario tanto en materias primas como en alimentos terminados. Al mismo tiempo, en sus laboratorios se estudian tecnologías térmicas como la pasteurización, esterilización y cocción bajo vacío y no térmicas como altas presiones hidrostáticas, biopreservación y tecnologías de barrera, que permiten asegurar la inocuidad y extender la vida útil de los alimentos.

Respecto a los componentes de los alimentos y su relación con la salud, el instituto desarrolla alimentos modificados reducidos en sodio, en grasa y en azúcares; también alimentos funcionales para lo cual se estudian compuestos bioactivos de interés nutricional como lípidos funcionales, vitaminas, polifenoles y péptidos.

En ese orden, los trabajos están orientados al desarrollo de métodos analíticos para la detección de alérgenos y en la evaluación de tratamientos para reducir la alergenicidad de los alimentos.

Vinculado a los aspectos éticos de la producción, se realizan estudios afines al bienestar animal (comportamiento y manejo periferia) y al estrés animal, en cuanto a su efecto sobre la calidad de carne y leche.

En la valorización de alimentos, se generan identificaciones con el territorio desde múltiples enfoques: patrimonialización, diferenciación y certificación; a lo que se suma el desarrollo de metodologías para establecer tipicidad sensorial y trazabilidad química o molecular.

En lo que se avizora para el sector de alimentos y bebidas para los próximos años, las principales innovaciones se orientan a la incorporación y utilización de nuevas tecnologías de procesamiento, de aprovechamiento de coproductos de la industria alimentaria con énfasis en la aplicación de tecnologías más limpias y la aplicación de las llamadas "ómicas", como son la nanotecnología, la biología sintética y la impresión 3D en el desarrollo de alimentos.

Líneas de trabajo y desarrollo de capacidades donde el INTA no solo incursiona, sino que forma investigadores y técnicos e incorpora tecnologías para afrontar esos nuevos desafíos.

Actualidad en I+D

Editorial

2

Atender las nuevas tendencias del consumo de alimentos

Las exigencias de los consumidores se presentan como desafíos a la industria y al sector vinculado a la ciencia y tecnología de los alimentos y bebidas. El INTA aporta capacidades, conocimientos y desarrollos que atienden a las nuevas tendencias.

Notas

4

Alimentos: el consumo responsable trastoca paradigmas

Especialistas abordan el tema del consumo de alimentos seguros y saludables, un requerimiento cada vez más prioritario y asociado a la salud. Analizan factores que hacen a la evolución del campo y de la industria y sus desafíos en adelante.



10

El resguardo del suelo se transformó en el reto del siglo

La incorporación de tecnología y prácticas de conservación ayuda a una problemática común: la erosión de los suelos. Expertos del INTA y otros organismos explican la importancia de sistematizar los lotes para reducir la erosión y las pérdidas económicas.



18

“El MACS G20 es una vidriera para el agro argentino”

El presidente del INTA, Juan Balbín, reflexiona sobre el encuentro de jefes científicos agrícolas a realizarse en Jujuy. Entre los temas propuestos se tratará “la salud de los suelos”, clave para la seguridad alimentaria y el desarrollo productivo.



Trabajos

Artículos

23

Uso de subproductos de planta de algodón como fuente de fibra en dietas de engorde a corral

Arroquy, J.I.; Lopez-Fernandez, C.J.; Lopez, A.

30

Estimación de biomasa aérea de *Grevillea robusta* A. implantada en la provincia de Misiones, Argentina

Barth, S.R.; Boca, T.; Giménez, A.M.; Joseau, M.J.; Gauchat, M.E.; Fassola, H. E.

41

Interacción entre festuca alta infectada con endófito y *Lotus tenuis* bajo dos frecuencias de defoliación

Petigrosso, L.R.; Assuero, S.G.; Vignolio, O.R.; Romano, Y.; Colabelli, M.N.; Salvat, A.; Cristos, D.

49

Caracterización de genotipos de *Gossypium hirsutum* L. sobre su tolerancia a estrés hídrico

Spoljaric, M.V.; Tcach, M.A.; Rojas, J.M.; Tarrago, J.R.; Cointry, E.L.

60

Drenes subsuperficiales: control de la salinización edáfica en producciones intensivas bajo cubierta

Cuellas, M.; Alconada Magliano, A.

69

Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis bovina en bovinos reactores positivos a la prueba tuberculínica

Garbaccio, S.G.; Delgado, F.O.; Zumárraga, M.J.; Rodríguez, L.R.; Huertas, P.S.; Garro, C.J.; Montiel, M.G.; Perelman, S.; De La Vega, A.J.

76

Essential oils from Argentinean native species reduce *in vitro* methane production

García, F.; Brunetti, M.A.; Lucini, E.I.; Scorcione Turcato, M.C.; Moreno, M.V.; Frossasco, G.P.; Colombatto, D.; Martínez, M.J.; Martínez Ferrer, J.

84

Pureza física y germinación de cariopses de *Chloris gayana* Kunth y *Panicum coloratum* L. cosechados de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico

García, M.D.; Pesqueira, J.; Otondo, J.

92

Pérdida de forraje ocasionada por diferentes densidades de *Dichroplus maculipennis* (Acrididae: Melanoplinae) en una pastura de *Festuca arundinacea* Schreb

Mariottini, Y.; De Wysiecki, M.L.; Lange, C.E.

101

Tolerancia a las heladas por superenfriamiento en cultivares de nogal (*Juglans regia*) y almendro (*Prunus amygdalus*)

Rodríguez, A.; Benítez Piccini, E.; Muñoz, A.

111

Actividad antifúngica de especies del género *Senna* (*Caesalpinioideae*, *Leguminosae*) del norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*

Facciuto, G.; Perez de la Torre, M.



DEMANDA EMERGENTE

ALIMENTOS: el consumo responsable trastoca paradigmas

Muy asociado a la salud, el componente sustentable es un requisito cada vez más ponderado por los consumidores a la hora de elegir alimentos. Prefieren conocer su procedencia, que tengan poco procesamiento y sean amigables con el ambiente. La evolución del campo y de la industria y sus desafíos en adelante.

POR DANIELA NOVELLI

Con mayor o menor influencia, la alimentación siempre fue una preocupación de las sociedades, vaya la aclaración para ser justos con el análisis de la actualidad. Siglos antes de Cristo, Hipócrates (460-357 a. C.) dijo: “Que tu alimento sea tu medicina”. Las revueltas precedentes a la Revolución Francesa estuvieron motivadas por el aumento en el precio de la harina. Cuando los españoles fundaron las ciudades en América, las Leyes de Indias preveían el establecimiento de un área de producción de alimentos conti-

gua a la urbe, si no había una población originaria de quien abastecerse. En *El Matadero*, Esteban Echeverría describió los problemas sanitarios de la Buenos Aires colonial. Y, en los 40 durante un Congreso Nacional de Nutrición, Ramón Carrillo, primer ministro de Salud del país, afirmó: “Hay que volver a la carbonada”, para advertir sobre el consumo excesivo de alimentos procesados.

De un salto a principios del siglo XXI, el consumo de alimentos comenzó a mostrar un viraje extendido socialmente

hacia la toma de conciencia. Consumo responsable, moda ética, ecología, agroecología, orgánico, bienestar animal, impacto ambiental, alimentos funcionales, etc., han sido términos cada vez más presentes en la enunciación de diferentes demandas que, como denominador común, denotan la preocupación por el cuidado del ambiente, de los recursos naturales y de la salud.

Al calor de este imaginario, la oferta – que contempla desde productores agropecuarios hasta empresas de la industria

“El consumo responsable se refiere a aquel consumo basado en una mirada 360° sobre el plato de comida o sobre la compra del supermercado” (Andrea Rochaix).



alimentaria— se mueve tan rápido como la capacidad técnica lo permite para entender climas de opinión, identificar factores ponderados en la elección de los alimentos, incorporar la adopción de tecnologías limpias, promover la reutilización de subproductos, probar innovaciones de I+D y elaborar productos modificados que satisfagan las expectativas nutricionales del cliente.

Para Andrea Rochaix, coordinadora del grupo de trabajo de Comunicación y Educación de la Sociedad Argentina de Nutrición, “no existe una definición específica sobre qué es el consumo responsable de alimentos, sino que implica varios enfoques que, en general, se refieren a aquel consumo basado en una mirada 360° sobre el plato de comida o sobre la compra del supermercado”.

En otras palabras, la licenciada en Nutrición, MN 1506, explicó que “esto quiere decir que no solo se mira el alimento por su valor nutricional en sí mismo, sino que además se consideran otros factores a la hora de la elección vinculados con el ambiente, la procedencia y la disminución de los desperdicios”.

En adición, Sergio Vaudagna, director del Instituto Tecnología de Alimentos del INTA, indicó que “el consumo de alimentos seguros y saludables es un requerimiento cada vez más prioritario, sobre todo en países desarrollados”.

De acuerdo con el especialista, además de ser valorados por la inocuidad,

son buscados aquellos alimentos modificados que contengan niveles reducidos de grasas, azúcares y sal y estén preparados con pocos o sin aditivos—concepto denominado “etiquetado limpio” o *clean label* en la traducción al inglés—. Otro aspecto de interés es la posibilidad de que los productos tengan propiedades “funcionales”, a partir de la incorporación de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

En este sentido, Lillian Corra, directora de la Carrera de Médico Especialista en Salud y Ambiente de la Facultad de Medicina de la UBA, enfatizó el incremento del consumo de “alimentos lo menos procesados posible, que incluyan poca cantidad de aditivos y sean lo más directos en la procedencia desde el productor”.

Por su parte, Diego Gauna, director del Instituto de Prospectiva y Políticas Públicas del INTA, reconoció que “las decisiones relativas al consumo de alimentos se están volviendo cada vez más complejas y sofisticadas”.

El licenciado en Economía remarcó que “si bien el precio, la seguridad en el consumo y el gusto siguen siendo *drivers* fundamentales, temas como la transparencia en la cadena de valor, la equidad en la distribución de los beneficios al interior de las cadenas, el impacto ambiental, el bienestar animal, el origen del producto, la medida en que un producto es ‘natural’, nutritivo y saludable, entre otros aspectos, están ganando ma-

yor peso en la toma de decisiones referidas al consumo de alimentos”.

Como ocurre en la dinámica social, los cambios surgen de procesos paulatinos, casi imperceptibles en el mientras tanto, y, por eso, resulta difícil establecer una fecha precisa de cuándo acontecen. No obstante, los especialistas estiman que este giro de percepción, interpretación y comportamiento en el abordaje del consumo de alimentos emergió con fuerza a principios del siglo XXI en el marco de una tendencia global, que se profundizará de la mano de generaciones jóvenes.

“En el futuro próximo, la búsqueda de alimentos será cada vez más exigente”, comentó Rochaix. “Cobrarán mayor importancia los denominados aspectos éticos, aquellos vinculados al bienestar animal, producción sustentable, huellas ambientales, compromiso social de las empresas, entre otros”, completó Vaudagna.

En tal contexto de valorización social, Gauna destacó que “los temas relacionados a la producción sostenible de ali-

“Las decisiones relativas al consumo de alimentos se están volviendo cada vez más complejas y sofisticadas” (Diego Gauna).

Tecnología en alimentos

Para Vaudagna, en los próximos años, las investigaciones de este campo de conocimiento harán énfasis en nuevas tecnologías de procesamiento, aprovechamiento de subproductos de la agroindustria alimentaria, aplicación de tecnologías más limpias y uso de nanotecnología y biotecnología en la elaboración de alimentos. De igual modo, apuntarán a abordar el diseño de nuevos envases, el desarrollo de nuevos alimentos –como los sintéticos o los producidos con impresión 3D– y la adopción de tecnologías “ómicas” como metabolómica, metagenómica y proteómica.

En este sentido, el Instituto Tecnología de Alimentos del INTA (ITA) avanza en la obtención de productos frutihortícolas IV y V Gama, a partir de la aplicación de nuevas tecnologías de procesamiento como tecnologías térmicas –cocción bajo vacío, por ejemplo– y no térmicas, que permiten asegurar la inocuidad de los productos y extender su vida útil. Allí, los especialistas también trabajan en el desarrollo de productos mediante la aplicación de tecnologías como altas presiones hidrostáticas y tecnologías *cook-chill*, como el sistema *sous vide* o bajo vacío.

En el instituto, se estudian otras estrategias como el pretratamiento de productos frutihortícolas para incrementar el contenido de compuestos bioactivos o el aprovechamiento de subproductos de la industria para la extracción y utilización de compuestos de interés, como los polifenoles.

Además, el ITA evalúa diferentes aspectos de la tecnología de carnes y productos cárnicos: inocuidad, calidad nutricional y sensorial, procesamiento y estabilidad-vida útil. Entre otros objetivos, estudian los efectos que ejercen los sistemas productivos (tipos de dietas, prácticas de bienestar animal, etc.) y el procesamiento sobre la calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de las carnes de distintas especies. En lácteos, la labor prioriza el desarrollo de productos funcionales y su caracterización fisicoquímica, nutricional y sensorial.

Por su parte, el análisis económico y prospectivo de los sistemas productivos, marcado por las tendencias de consumo y la configuración global del mercado agroalimentario, es llevado adelante por equipos de investigación en el ámbito del Centro de Ciencias Políticas, Económicas y Sociales del INTA, dentro del cual se integran los institutos de Prospectiva y Políticas Públicas y de Economía.

Entre los temas de estudio que son abordados, analizan la geopolítica de los alimentos y la energía, la disposición a pagar por atributos de los alimentos y las características de las balanzas exportadoras de los principales países productores. Asimismo, trabajan en la comprensión de los impactos de las nuevas tecnologías sobre los sistemas productivos, las dinámicas de la producción periurbana en las principales metrópolis latinoamericanas, entre otros.



mentos comenzarán a consolidarse y a ejercer una mayor influencia sobre las cadenas productivas y sobre las agendas públicas y privadas de investigación y desarrollo en el sistema agroalimentario”.

La producción de alimentos con atributos saludables y amigables con el ambiente “dejará de ser un nicho de mercado para convertirse en una parte esencial de la estrategia a lo largo de toda la cadena de valor”, sostuvo.

El posicionamiento de lo sustentable como valor diferencial se sobrepone a “un tipo de consumidor que solo miraba marcas y elegía los productos sin preocuparse mucho más que por completar la canasta básica, con poco interés en la información nutricional de las etiquetas”, recordó Rochaix.

En cuanto al perfil, la especialista dijo que “el consumidor medio argentino es racional, moderado y desconfiado, principalmente por las crisis económicas que le ha tocado atravesar”. “Piensa, planifica su compra, busca precios y cuestiona las segundas marcas de los supermercados, así como ciertas promociones”, detalló.

No obstante, aseguró que, en general, las encuestas indican que se trata de “un consumidor dispuesto a pagar más por aquellos productos que le hagan bien y tengan un valor agregado comprobable para la mejora de su salud”.



“El consumo de alimentos seguros y saludables es un requerimiento cada vez más prioritario, sobre todo en países desarrollados”
(Sergio Vaudagna).

Según el reporte de febrero de 2018 de la encuesta de demanda de alimentos que elabora la Universidad del Estado de Oklahoma para analizar las preferencias de los consumidores mes a mes, los consumidores, en primer orden, priorizan el gusto, la seguridad, el precio, el contenido nutricional y la apariencia en el consumo de alimentos. En segundo orden de relevancia, se ubican el nivel “natural” del producto, el bienestar animal, la conveniencia y el origen.

“Una lectura más detallada de la encuesta muestra que no existen diferencias significativas por grupo etario en relación con la priorización de primer orden (gusto, seguridad y precio), como sí se observan entre los factores de segundo orden”, argumentó Gauna, quien agregó: “Los ‘millennials’ otorgan una mayor importancia relativa a si el producto es ‘natural’, al impacto ambiental y al bienestar animal en comparación con las generaciones más adultas”.

Para Corra, quien también se desempeña como coordinadora de Posgrado en Salud y Ambiente del Instituto para el Desarrollo Humano y la Salud, “la generación que ronda entre los 25 y 35 años suele interesarse en la alimentación y busca información”. “Esta transformación es buena, en relación con generaciones anteriores que tendían a considerar la información que recibían como hechos de facto y, hoy, aprendimos a preguntarnos

qué necesitamos y qué podemos procurar”, alentó.

En esta línea, resaltó que la disponibilidad de información proporcionada por las TIC ayudó a que “las personas priorizaran la necesidad de tener una alimentación sana y acorde a la demanda de energía que exige su estilo de vida”. “Esta tendencia supone un consumidor distinto, observada no solo en las mujeres como solía suceder, sino también en los varones”, analizó Corra.

A modo de esbozo, Rochaix detalló que “la generación de los millennials hace varias cosas a la vez, actúa con una rapidez abrumadora y está pendiente de verse y sentirse bien”. “Hace compras por Internet, se embebe de información antes de realizarlas, se preocupa por el ambiente y le importa mucho el disfrute de la comida, es decir, la posibilidad de ingerir alimentos que sean saludables y ricos”, agregó.

Agroindustria en transformación

La fragmentación y evolución de las preferencias de los consumidores generan nuevos desafíos y oportunidades para la industria alimentaria e, independientemente del tipo de mercado que se quiera atender, la sostenibilidad tiende a constituirse en el eje central de la producción de alimentos.

En el contexto actual de apertura de mercados internacionales, más allá de la recuperación de los tradicionales, “el desarrollo de alimentos premium y orgánicos tiene un alto potencial, así como el de aquellos que minimicen las huellas hídricas y de carbono en sus procesos de producción”, explicó Gauna.

Sin embargo, las nuevas tendencias globales de consumo requieren inversiones en investigación que permitan potenciar la competitividad argentina. “En el país, el peso de la inversión privada en I+D es escaso y, por eso, las inversiones públicas son esenciales para la adopción y desarrollo de tecnologías emergentes que incrementen la preservación y calidad de los alimentos”, amplió Gauna.

Hacia adentro de las actividades productivas, los especialistas coinciden en que la mejora en la trazabilidad de los procesos de producción resulta un aspecto clave para incrementar la transparencia de la cadena y garantizar la inocuidad de los alimentos. De igual modo, la adopción de buenas prácticas agrícolas que procuren un uso más eficiente de los insumos y reduzcan el impacto ambiental.

La información fehaciente sobre composición y calidad de alimentos es condición imprescindible para que exista consumo responsable. Esto implica, del lado de la oferta, poner a disposición da-

“El principal problema que aqueja a la horticultura nacional es el bajo consumo y la alta merma registrada en etapa logística” (Mariano Winograd).



tos verídicos y, del lado de la demanda, tener una actitud proactiva para realizar una interpretación adecuada de aquello que lee, oye o ve.

“Hace falta educación alimentaria fiable y basada en la evidencia científica que permita complejizar algunas ideas que se instalan”, expresó Rochaix, quien resaltó el rol de espacios como escuelas y supermercados para que, desde sus lugares, trabajen por la valoración de los alimentos.

En el plano productivo, Gauna puntualizó: “En la actualidad, no alcanza con adoptar buenas prácticas agrícolas para acceder a un consumidor que valora dicho atributo, sino que se deben buscar mecanismos de proveer información como la certificación de los procesos de producción y el etiquetado de los alimentos”.

Dilemas de la horticultura

Es repetida la sugerencia de ingerir frutas y verduras, coloridas, crudas y en diferentes preparaciones, para cumplir con una dieta saludable. Pero se trata de un consejo que, actualmente, no impregna en la demanda al punto ideal.

De acuerdo con estimaciones de la OMS, el consumo recomendable de frutas y verduras es de 400 gramos por día, sumado al de hortalizas amiláceas (papas, batatas, choclo, por ejemplo) que representan entre 100 y 200 gramos

más a la dieta diaria. En la Argentina y en los países de América Latina, el consumo se ubica en la mitad.

“El principal problema que aqueja a la horticultura nacional es el bajo consumo y la alta merma registrada en etapa logística”, subrayó Mariano Winograd, ingeniero agrónomo y referente de la organización internacional “5 al día” en la Argentina. Según datos de la FAO, las pérdidas en el ciclo comercial-logístico pueden ascender al 45 %.

No obstante, el experto es optimista y mira con buenos ojos que la situación tienda a revertirse a partir de la preeminencia de la idea de sustentabilidad en el imaginario social, que concibe con ciertos reparos.

“En la percepción actual se conjuga cierta preocupación, responsabilidad ambiental, compromiso con la salud, lo cual es positivo, pero el consumidor no está del todo informado y hay algunas palabras como orgánico, biológico, ecológico que han adquirido un peso desmesurado”, afirmó Winograd.

En este sentido, pidió prudencia a la hora de sobreestimar o demonizar el uso de insumos de la industria química y recomendó utilizarlos de manera responsable, en el marco de un esquema de buenas prácticas diseñado a partir de una evaluación holística del sistema agrícola donde se emplean.

“Los recursos genéticos y químicos son recursos tecnológicos que el agricultor puede y debe usar responsablemente para mejorar el manejo completo del sistema, sumado a un uso eficiente del agua y de la energía”, aclaró.

Otro de cuestionamientos que sufre el sector frutihortícola es el precio. ¿Hay bajo consumo por altos precios? Winograd lo definió como “un dilema para el que no hay una respuesta única, simple y fehaciente”, si se tiene en cuenta que, por ejemplo, “la Argentina es uno de los países cuya población toma más gaseosas por habitante y hay problemas de obesidad infantil”.



Esto podría indicar que, si bien hay problemas de distribución en los ingresos, existe un componente cultural que prioriza a qué productos se destina el presupuesto alimentario. “Es un análisis complejo, para el que necesitamos establecer un acuerdo que permita evaluar los distintos alimentos por su valor de uso y no meramente por su valor de cambio, porque es difícil compararlos”, sostuvo el especialista.

En la misma línea, argumentó que “el precio está condicionado por la cantidad de mermas, ya que el comercio tiene que absorberlas con su margen”. Para Winograd, un país como la Argentina, con cierta infraestructura y desarrollo, podría proponerse reducir a la mitad las pérdidas en un plazo aproximado de cinco años. “Esto generaría una enorme transformación en los costos de la distribución”, aseguró.

Además de las mermas que se generan, la logística perjudica la sustentabilidad de la horticultura, sobre todo por el costo energético que deriva del transporte de alimentos frescos desde los mercados centrales hacia la gran cantidad de localidades del interior del país que no poseen producciones frutihortícolas desarrolladas a escala para garantizar el abastecimiento local.

En auge en países de Europa y sugerido por la FAO, el modelo de los mercados concentradores fue tomado por la Argentina entre las décadas de 1960 y 1970 e implementado en los 80 a partir de la apertura de mercados como el de Buenos Aires y el de La Plata. “En aquel

momento, la idea era conformar una red de interés nacional, ya que se creía que la forma de modernizar era concentrando las operaciones para reducir la intermediación”, explicó Winograd.

Pero, una década más tarde, el modelo dio los primeros signos de agotamiento y comenzó a entenderse que los supermercados iban a ser los actores que consolidaran una provisión dinámica de alimentos. “El supermercadismo hoy también está en crisis, muy cuestionado por el comercio de alimentos multiprocesados que no contribuyen a una buena alimentación”, señaló.

En este panorama de marchas y contramarchas, 30 años después, “se cree que el transporte de productos a largas distancias tiene un costo, principalmente, ambiental y energético que no es conveniente y hay una tendencia hacia la puesta en valor de la proximidad, así como del rol de las ciudades en la producción de frutas y verduras, que son respondidas con soluciones tecnológicas como la hidroponía o el cultivo en terrazas”, analizó Winograd.

De acuerdo con el especialista, existe el conocimiento tecnológico necesario para avanzar en el desarrollo de producciones locales. “La pregunta es quiénes serán los productores que las van a llevar a cabo”, advirtió. En la Argentina, la labor hortícola siempre estuvo en manos de inmigrantes –italianos, portugueses, bolivianos– y un cambio de este tipo exigiría un mayor caudal de mano de obra.

A la par, remarcó la importancia de recomponer la demanda local, en el sentido que prefiera y reconozca el producto de su tierra. “El desafío es que los consumidores valoricen el producto local, a partir de una toma de conciencia”, observó.

Por último, Winograd reflexionó: “Se vienen cambios muy grandes para el campo y la industria de alimentos, debido a que hay una gran toma de conciencia en todas las clases sociales en relación con la certeza de que la alimentación que estamos llevando no es pertinente con el deseo de vivir muchos años con calidad de vida”.

Se trata de un juego de evolución que obliga a cambiar paradigmas.

Más información: *Andrea Rochaix* andrearochaix@gmail.com; *Sergio Vaudagna* vaudagna.sergio@inta.gob.ar; *Lilian Corra* liliancorra@gmail.com; *Diego Gauna* diego@inta.gob.ar; *Mariano Winograd* mariano.winograd@gmail.com

“Hace falta educación alimentaria fiable y basada en la evidencia científica que permita complejizar algunas ideas que se instalan”
(Andrea Rochaix).



AGRICULTURA SUSTENTABLE

El resguardo del suelo se transformó en el reto del siglo

En la Argentina, es la principal fuente de ingresos y motoriza la economía nacional. Gracias a la incorporación de tecnología y prácticas de conservación, en los últimos años, se cuadruplicó la cantidad de granos producidos por hectárea. Esto ejerce mayor presión sobre un recurso que no recibe los cuidados adecuados. En este contexto, la sistematización de los lotes ayudaría a reducir la erosión del suelo y las pérdidas económicas.

POR CECILIE ESPERBENT



El extenso territorio argentino está formado por los 12 tipos de suelos conocidos, una característica que ubica al país dentro del 3 % de las tierras con mayor aptitud agrícola del planeta. El dato cobra mayor relevancia si analizamos que la Argentina produce alimentos para 400 millones de personas con costos relativamente bajos y con los estándares de calidad requeridos por los mercados más exigentes.

Sin embargo, los sistemas agropecuarios –basados en el uso del suelo– son la

principal fuente de ingresos, motorizan la economía nacional y ejercen mayor presión sobre un recurso que no recibe los cuidados adecuados. De hecho, un estudio científico, realizado por especialistas del Instituto de Suelos del Centro de Investigación de Recursos Naturales del INTA, determinó que alrededor del 26 % del territorio argentino presenta niveles de erosión hídrica que superan las tasas tolerables. De allí se desprende que al año se pierden alrededor de 1.500 millones de metros cúbicos de suelo, dicho

de otro modo, una capa de 0,5 milímetros de espesor.

“Estamos perdiendo no solo aquellos suelos que son la base de las producciones agropecuarias del país, sino que descuidamos los servicios ecosistémicos que nos prestan, como el almacenamiento de carbono”, señaló Miguel Taboada, director del Instituto de Suelos del INTA, quien agregó: “Es el recurso que soporta la biodiversidad más rica que hay sobre la tierra y, además, funciona como un filtro y es un regulador de contaminantes

“Es importante entender que estamos hablando de un recurso que no se renueva en la escala de vida humana, debido a que recuperar un centímetro de suelo erosionado puede tardar hasta 1.000 años” (Miguel Taboada).

“El riesgo de que un incremento de la agricultura genere mayor erosión o degradación de suelos es real, existe, pero lo que degrada el suelo es la forma en que se realiza la actividad” (Gabriel Vázquez Amabile).

vuelve más compleja. Pero este, no es un problema nuevo. En 1957, un grupo de productores del centro oeste de la provincia de Buenos Aires se reunió para resolver una problemática común: detener la erosión de los suelos. Así nació CREA (Consortio Regional de Experimentación Agrícola).

“En los últimos 50 años la producción agrícola del mundo aumentó un 30 % per cápita, es decir, que creció más rápido que la población del planeta”, expresó Gabriel Vázquez Amabile, líder del proyecto Ambiente de la Asociación Argentina de Consortios Regionales de Experimentación Agrícola (Aacrea), y aclaró: “Solo un 15 % de este incremento tuvo que ver con la incorporación de nuevas hectáreas, mientras que el 85 % restante se debió a la adopción de tecnología: genética de semillas, mayor conocimiento científico y conciencia por el cuidado del suelo”.

“Sobre los mismos suelos y con las mismas lluvias producimos muchos más granos por hectárea que hace 50 años atrás y esto es eficiencia de recursos”, resaltó Vázquez Amabile y agregó: “El riesgo de que un incremento de la agricultura genere mayor erosión o degradación de suelos es real, existe, pero lo que degrada el suelo es la forma en que se realiza la actividad”.

La transición de un sistema de agricultura con labranza convencional a uno con siembra directa permitió la mejora considerable de los rendimientos y, además, de los niveles de materia orgánica en el suelo. “No obstante, las regiones son distintas y esto puede virar hacia esquemas que incluyan más cereales en las rotaciones junto con cultivos de cobertura, o planteos mixtos en siembra di-

inorgánicos y orgánicos, así como de microorganismos patógenos y virus”.

Para Taboada, la presión que se ejerce sobre el suelo está llegando a límites críticos. “Es importante entender que estamos hablando de un recurso que no se renueva en la escala de vida humana, debido a que recuperar un centímetro de suelo erosionado puede tardar hasta 1.000 años”, advirtió.

En la actualidad, solo un 11 % de la superficie del planeta corresponde a suelos con potencial agrícola. Estimaciones de la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, por sus siglas en inglés) plantean que, en los próximos 20 años, más del 80 % de la expansión de la superficie cultivada se producirá en América Latina y África subsahariana.

Formado –en promedio– por 45 % de arena, limo y arcilla, 5 % de material orgánico y 50 % de espacio poroso ocupado por aire, agua y microorganismos, el suelo es fundamental para la seguridad alimentaria del mundo. Según la FAO, de

allí proviene el 95 % de los alimentos que se consumen. Sin embargo, alrededor de 2.000 millones de hectáreas están deterioradas en forma irreversible y, de las 1.500 millones que están en uso, una tercera parte posee procesos de degradación que varían de moderados a graves.

“Uno de los desafíos más significativos que afrontará la humanidad es el deterioro de los recursos naturales y, principalmente, el de los suelos cultivados”, vaticinó Roberto Casas, director del Centro para la Promoción de la Conservación del Suelo y del Agua de la Argentina (Prosa) de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (Fecic).

“El mundo no comprende que la vida sobre la tierra depende de las diferentes funciones que cumple esa delgada capa de suelo que intentamos proteger. Ese manto fértil –que en términos generales varía de 10 a 30 centímetros de espesor– nos asegura la provisión de alimentos y el uso sustentable del agua”, reflexionó Casas.

A medida que aumenta la demanda mundial de alimentos, la situación se

59 años de historia, 59 años de erosión



“La lluvia se lleva la materia orgánica y los nutrientes que están en los primeros 20 centímetros. Es un proceso rápido y degrada la fertilidad del campo” (Jorge Gvozdenovich).

recta de rotación con pasturas para mejorar las propiedades del recurso”, indicó el líder del proyecto Ambiente de Aacrea.

Sistematización de los lotes

El vasto territorio argentino alberga una delicada diversidad de tierras. Pero el problema de la erosión no es solo por las pendientes que tienen los suelos, sino por las lluvias: la cantidad de agua caída por minuto y la frecuencia marcan la diferencia y pueden hacer que el problema cambie de categoría —leve, moderado o severo—.

De acuerdo con Jorge Gvozdenovich, especialista en manejo y conservación de suelos del INTA Paraná —Entre Ríos—, “cuando llueve, la gota golpea contra el suelo y, el grado y la distancia que tenga la pendiente del paisaje hacen que el agua que no se infiltra en el lote tome velocidad y arrastre el mejor suelo que tenemos”.

“La lluvia se lleva la materia orgánica y los nutrientes que están en los primeros 20 centímetros. Es un proceso rápido y degrada la fertilidad del campo”, expresó Gvozdenovich y advirtió: “Si no se controla, la erosión reduce los rindes de los cultivos”.

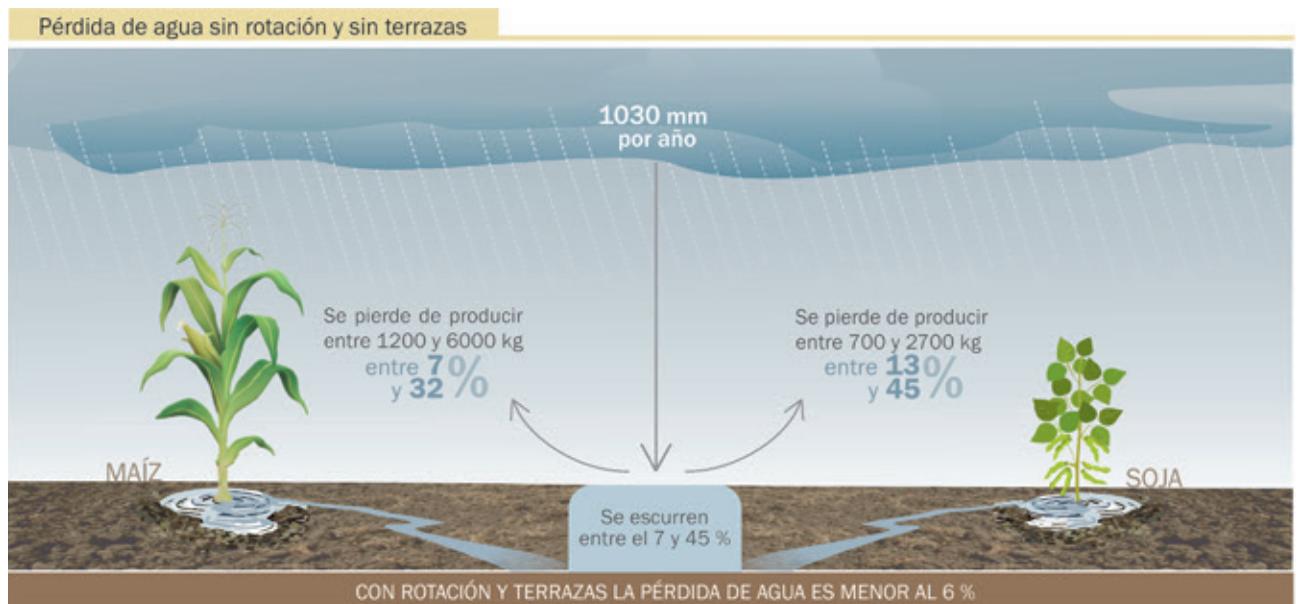
Por esto, determinar el riesgo de erosión es fundamental para la conservación de los recursos, sobre todo porque la pérdida de unos pocos centímetros de suelo puede impactar de manera irreversible en el potencial productivo de los cultivos.

De acuerdo con Federico Fritz, especialista en suelos del área Ambiente de Aacrea, la pérdida de productividad de las tierras, no solo daría lugar a menores rendimientos agrícolas, sino también provocaría cambios socioeconómicos en muchas regiones. “Nuestro país todavía depende muchísimo de la producción agropecuaria para el empleo directo e indirecto, la cadena agroindustrial y la recaudación impositiva nacional, provincial

y municipal, por lo que conservar el suelo es fundamental para la sostenibilidad de las generaciones futuras”, analizó y agregó: “Por esto, seguimos probando nuevos sistemas de producción e incorporando tecnología”.

Desde hace varias décadas, la Argentina centra la mayor parte de la discusión en temas vinculados al suelo y al desarrollo de tecnologías para conservarlo. “En otros países, no es común la gran participación de productores y técnicos a jornadas, charlas y congresos organizados por asociaciones privadas como Aacrea o Aapresid junto con el INTA, las universidades nacionales y asesores privados”, puntualizó Fritz. Y ponderó: “Esto muestra un gran compromiso y responsabilidad por proteger nuestros recursos”.

Para Juan Gaitán, especialista del Instituto de Suelos del INTA, el problema, lejos de revertirse, tenderá a agravarse en el futuro. “El aumento en la demanda mundial de alimentos impulsará una



Revisión técnica: Jorge Jesús Gvozdenovich | Infografía: Área de Comunicación Visual, GeCom

“La sistematización de los lotes con terrazas de evacuación es una estrategia sustentable y está comprobado que reduce hasta un 90 % la erosión” (María Fabiana Navarro).



mayor presión de uso sobre los recursos naturales y, sumado al cambio climático que provocará eventos extremos de precipitaciones más frecuentes, acentuará mucho más la erosión”.

La consecuencia inmediata de la degradación “es una disminución de la productividad agrícola, debido a su deterioro físico, a la pérdida de nutrientes y profundidad y, en casos extremos, la pérdida total del suelo”, indicó Gaitán, quien explicó que “todo esto contribuye a incrementar la brecha que existe entre el máximo rendimiento potencial de los cultivos y el obtenido finalmente por los productores agropecuarios”.

“La expansión de la frontera agropecuaria, sobre todo en la región subhúmeda pampeana y chaqueña, mediante la incorporación de tierras al cultivo intensivo de granos —especialmente de soja— reduce la protección que tiene el suelo de la vegetación y, junto con el sobrepastoreo en zonas áridas y semiáridas, provocaron un aumento de la erosión hídrica en las últimas décadas en el país”, explicó Gaitán.

Cada centímetro de suelo fértil que se pierde tiene un costo económico. Patricia Carfagno, una de las autoras del trabajo que estima la pérdida de suelo en la Argentina, señaló que “la soja rinde 95 kilos de granos menos por hectárea, el maíz 273 kilos y el trigo hasta 71 kilogramos menos”. Y agregó: “Si a estos números se los analiza en términos económicos, la pérdida total superaría los 29,9 millones de dólares al año”.

En ese contexto, la fórmula para una producción más sustentable es una agricultura que proteja y aproveche mejor los recursos. “La sistematización de los lotes con terrazas de evacuación es una estrategia sustentable y está comprobado que reduce hasta un 90 % la erosión”, aseguró María Fabiana Navarro, especialista del INTA y coautora del libro publicado por el instituto en diciembre de 2017.

De todos modos, la difusión y rápida adopción de la siembra directa en los campos argentinos ayudó a amortiguar el impacto de la erosión en lotes que se trabajaban con labranza tradicional —im-

plicaba el corte y movimiento total o parcialmente de los primeros 15 centímetros de suelo—.

Preocupados por la erosión que afectaba a los suelos, en 1989, un grupo de productores impulsó la evolución del paradigma agrícola mediante la difusión de la siembra directa. Así, desde hace más de 30 años, la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (Aapresid) adopta e impulsa la difusión de una agricultura sustentable, basada en el uso racional e inteligente de los recursos naturales mediante el acceso al conocimiento y la innovación tecnológica.

“La siembra directa por sí sola no alcanza para controlar la pérdida de suelo”, aseguró Pablo Guelperin, profesor de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER) y técnico de Aapresid, y añadió: “Cuando uno recorre los lotes puede ver que el ritmo de la erosión es considerablemente menor, en comparación con campos en los que se usaban arados para labrar y remover el suelo”.

Sin embargo, “no debemos perder de vista que hay señales, como los pequeños surcos originados por el relieve, más las huellas que dejan las máquinas que generan cárcavas que permanecen de una campaña a otra”, alertó Guelperin y agregó: “Con una buena rotación de cultivos y cultivos de servicio —llamados cultivos de cobertura—, se mejora el sistema, protege el suelo y aporta nuevas soluciones a otras variables, como el control de malezas y la incorporación de nutrientes y materia orgánica al suelo”.

Guardianes del suelo

En el marco de la Alianza Mundial por el Suelo (AMS), la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (Aapresid) recibió el premio Glinka World Soil Prize.

Se trata del galardón que otorga la FAO a personas y organizaciones que contribuyen a la promoción de la gestión sostenible del suelo y la protección de los recursos. Es la primera vez que una entidad argentina recibe un estímulo como este.

Terrazas

En la Argentina, como consecuencia del aumento en la producción de granos y carnes productores e ingenieros agrónomos tuvieron que profundizar el estudio y conocimiento del suelo y de los procesos erosivos.

En 1968, el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (PNUD), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) establecieron el Proyecto de Conservación de Suelos en Entre Ríos, nordeste de Buenos Aires, sureste de Córdoba y sur de Santa Fe (Proyecto ARG 26. 1968).

La agudización del ingenio, los llevó a darle mayor difusión y poner en práctica la siembra de cultivos en contorno para controlar la erosión. “Fue una técnica sencilla, eficaz y básica para la conservación; aumentaba la producción, disminuía la escorrentía y reducía la pérdida de suelo”, describió Gvozdenovich.

Años más tarde, las investigaciones se orientaron hacia terrazas a nivel y terrazas con caída progresiva y otras técnicas de conservación, como franjas de cultivos, rotaciones y el efecto del manejo de los rastrojos.

Según datos del Prosa, en la Argentina, por el tipo de paisaje e intensificación de las actividades agropecuarias, sería recomen-

dable la realización de cultivos en terrazas, en unas cuatro millones de hectáreas.

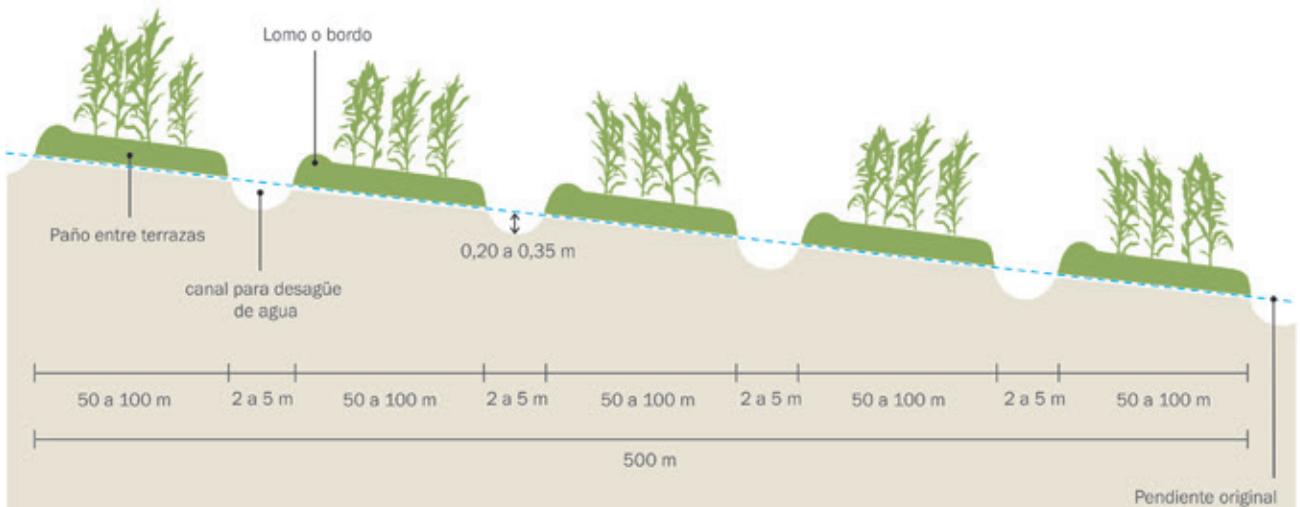
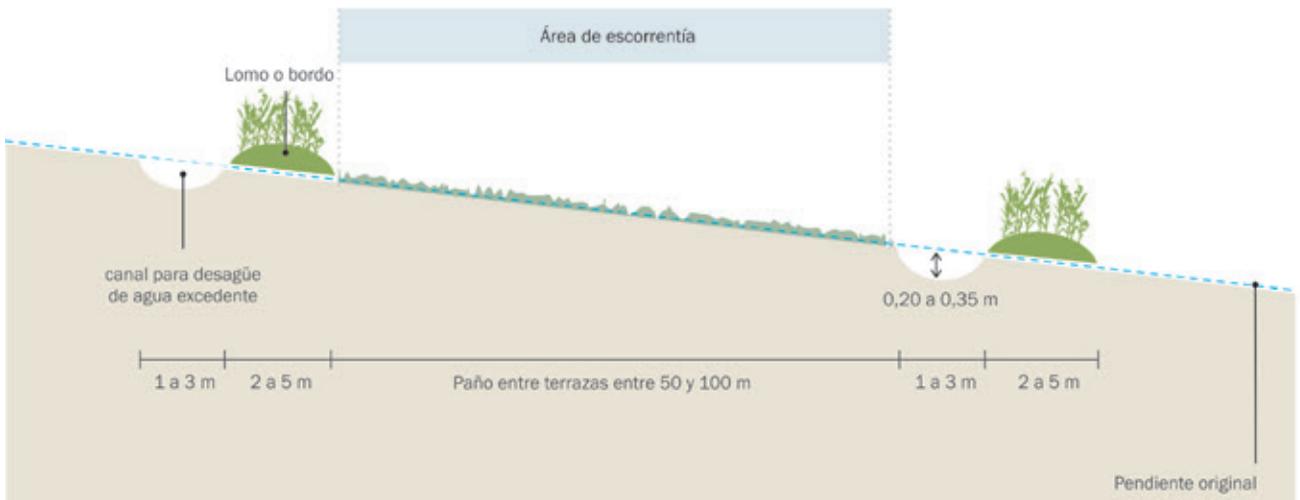
Sin embargo, la realidad es otra. “En la actualidad, se estima que la superficie sistematizada con terrazas para el control de la erosión llega a unas 900.000 hectáreas”, confirmó Casas y analizó: “Es imperioso que la aplicación de esta tecnología se extienda a las tierras onduladas de Salta, Jujuy, San Luis y algunos sectores de Santiago del Estero, además de continuar su difusión en la región pampeana, principalmente en el sudeste de Córdoba, sur de Santa Fe y norte y sur de Buenos Aires”.

La Estación Experimental Agropecuaria del INTA en Paraná –Entre Ríos– es pionera en el desarrollo de tecnologías

Terrazas para conservar y producir

Terrazas de base angosta o no sembrable

Recomendada para suelos poco profundos, arcillosos o impermeables.



para el control de la erosión hídrica. “En la provincia, la construcción de terrazas en los lotes hoy representa solo el 25 % del área agrícola”, destacó Gvozdenovich y agregó: “Si tenemos en cuenta que casi el 70 % de los suelos aptos para cultivos tienen distintos grados de erosión, vemos que todavía tenemos un largo camino por recorrer en la preservación del recurso”.

Técnicamente, el concepto de terrazas explica que son terraplenes formados por bordes de tierra y canales que se construyen de manera trasversal a la pendiente para cortarla. De este modo, interceptan el escurrimiento de las lluvias y ayudan a disminuir la velocidad que alcanza el agua superficial; se reduce la erosión y aumenta la infiltración de agua en el suelo.

Si bien su construcción es simple y la inversión que implica se recupera a los pocos años, para su diseño y realización, Carfagno explicó que hay varios factores que es necesario tener en cuenta como: el clima, la topografía, las características del suelo, maquinaria y recursos económicos disponibles, incluso se debe considerar si el trabajo será realizado por contratistas o por el propietario.

“Tanto las precipitaciones y el caudal de agua que aporta la microcuenca como las características de los suelos determinarán si se recomienda una terraza de absorción para almacenar los excedentes de agua o una de desagüe

En Entre Ríos, la protección del suelo es ley

Sancionada en Paraná –Entre Ríos–, el 5 de julio de 1990, la ley N° 8.318/89 declara el “interés público por el manejo conservacionista de los suelos de la provincia que, por sus condiciones naturales y por acción antrópica, manifiesten síntomas o susceptibilidad de degradación”.

El objetivo de la ley fue incentivar a los productores para que adopten prácticas conservacionistas –terrazas de evacuación y curvas de nivel, entre otras– mediante una desgravación impositiva que aliviara el costo de inversión necesario para la implementación de aquellas tecnologías.

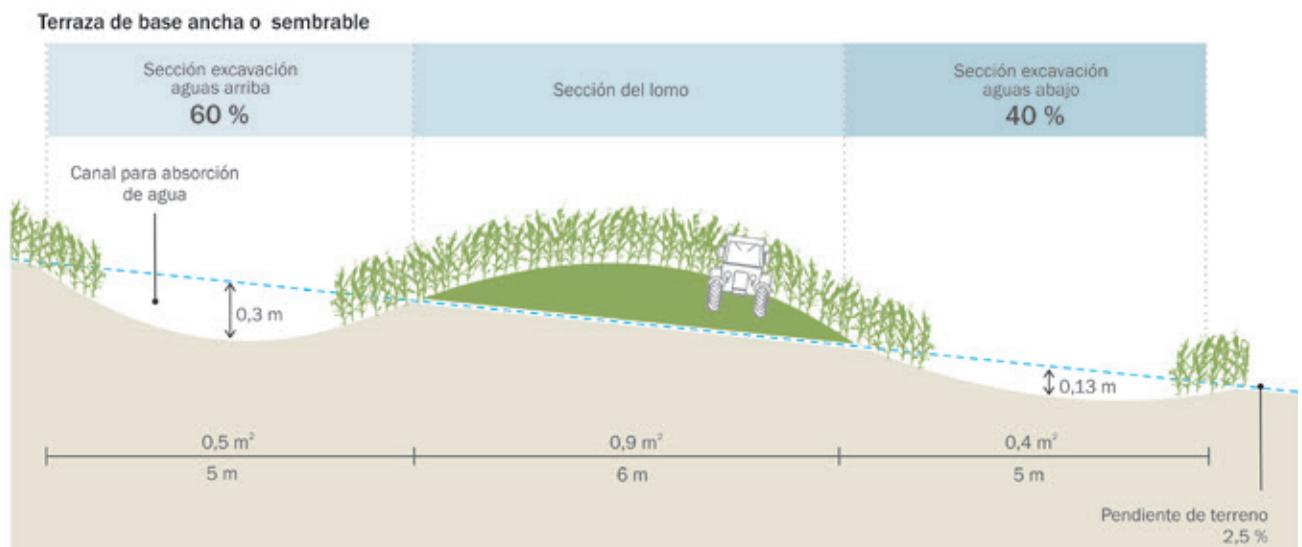
“Entre Ríos es una de las pocas provincias en el mundo que tiene una Ley para la conservación del suelo”, manifestó Gvozdenovich y dijo: “Prevé la reducción del 35 % del impuesto inmobiliario por 10 años para aquel productor que sistematice el campo”.

Según las características de los trabajos de conservación realizados, la Ley establece –para prácticas permanentes– la reducción del Impuesto Inmobiliario Rural provincial sobre la superficie afectada con este tipo de prácticas durante un plazo no mayor de diez (10) años y siempre que las prácticas se mantengan durante ese período.

Para acceder al beneficio de las desgravaciones impositivas, los contribuyentes del Impuesto Inmobiliario Rural, deberán presentar ante la Dirección de Suelos y Aguas un Plan de Manejo y Conservación, avalado por un estudio técnico efectuado por un ingeniero agrónomo matriculado, previamente visado por el Colegio de Profesionales de la Ingeniería de Entre Ríos.

“Hay un camino largo por recorrer en la conservación del suelo”, aseguró Taboada y puntualizó en la aplicación y cumplimiento de leyes y regulaciones sobre el uso y conservación de los recursos. “Entre Ríos es pionera en el fomento de prácticas conservacionistas”.

“Es importante entender que, a pesar de que el suelo tenga un propietario, es un bien de uso social que debe ser conservado y mejorado para las generaciones futuras”, resumió Taboada.



Revisión técnica: Jorge Jesús Gvozdenovich | Infografía: Área de Comunicación Visual, GeCom

para conducirlos fuera del lote”, detalló Carfagno y añadió: “Cuando son suelos profundos y permeables se puede hacer cualquier tipo de terraza, en cambio, en suelos poco profundos, arcillosos o impermeables, es recomendable construirlas con gradiente que permitan la salida de los excedentes hídricos”.

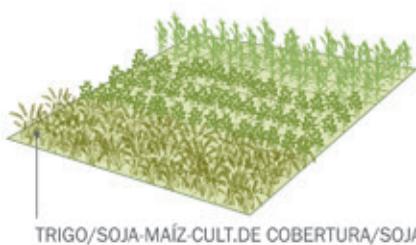
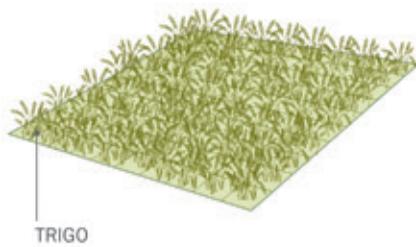
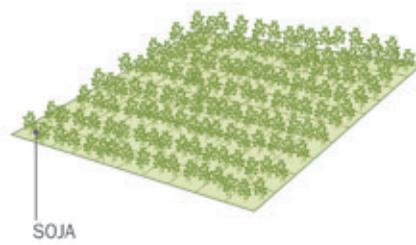
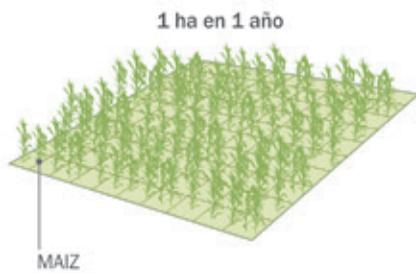
En este sentido, Guelperin puso el foco en la necesidad de generar conciencia sobre la importancia que tiene la siste-

matización del lote y el mantenimiento de las terrazas. “Muchas veces, los proyectos no se realizan con el tiempo necesario para que los canales y lugares críticos sean cubiertos con algún cultivo, antes de que se envíen los caudales conducidos”, advirtió.

En San Luis, un 15 % de la superficie es susceptible a la erosión y se puede sistematizar. Juan Cruz Colazo, investigador en manejo y conservación de suelos

El impacto productivo de la pérdida de suelo

= 6 t = 50 kg



“El riesgo de erosión aumentó considerablemente debido al incremento de lluvias extremas, la disminución de la cobertura vegetal por la simplificación de los sistemas de producción y las malas prácticas de manejo, como la siembra a favor de la pendiente” (Juan Cruz Colazo).



del INTA, indicó que “en la provincia, los suelos necesitan protección porque son frágiles, poseen una débil estructuración y un bajo contenido de materia orgánica”.

En los últimos años, “el riesgo de erosión aumentó considerablemente debido al incremento de lluvias extremas, la disminución de la cobertura vegetal por la simplificación de los sistemas de producción y las malas prácticas de manejo, como la siembra a favor de la pendiente”, marcó Colazo.

En las zonas más vulnerables, como en la cuenca de La Petra, El Morro y otros sectores serranos, las terrazas ayudarían a reducir la velocidad del escurrimiento superficial del agua y disminuiría su efecto erosivo. “Su construcción mejora visiblemente las consecuencias en los suelos, por un lado, disminuyen los riesgos de encharcamiento e inundación y, por el otro, en el primer año, se observan incrementos en el rendimiento de los cultivos debido a la mayor eficiencia en el uso del agua”, argumentó el especialista del INTA San Luis.

En la Argentina, la erosión hídrica y eólica avanzó a un ritmo que pocos pudieron predecir, pero que algunos tuvieron la responsabilidad de registrar. Según

datos del investigador español Víctor Hugo Duran, en 1956, la erosión en el país alcanzaba unas 35 millones de hectáreas. En 2005, Roberto Casas –en el marco de una investigación realizada en el INTA– actualizó el número: 60 millones de hectáreas. Con un crecimiento exponencial, el Prosa confirma en 2015 que las tierras degradadas ascienden a 100 millones de hectáreas.

Responsabilidad de todos

Para proteger el suelo es necesario una agricultura sustentable, pero también hace falta mayor conciencia sobre la importancia de su conservación. “Resguardar su integridad y sus funciones constituye un deber inexcusable, debido a que se trata de un recurso natural estratégico para la nación”, manifestó Casas.

“Es necesario establecer políticas públicas, mediante la implementación de una Ley Nacional de Conservación del Suelo que promueva –mediante incentivos– la aplicación de buenas prácticas agropecuarias, especialmente en zonas críticas”, reflexionó Casas.

En la primera investigación realizada por especialistas del Instituto de Sue-

los a escala nacional en los últimos 30 años, con la finalidad de contribuir al ordenamiento y manejo sustentable de los suelos, se presenta un mapa donde se ubican las cuatro millones de hectáreas sobre las que podrían realizarse terrazas.

“Esa superficie podría ampliarse considerablemente si se contempla el otorgamiento de incentivos a los productores”, replicó Gaitán y acentuó: “Nuestro estudio es una herramienta que permite identificar las áreas más críticas. A partir de este conocimiento, se podrían diseñar políticas públicas que propicien la adopción de prácticas conservacionistas para el manejo de los suelos”.

Más información: Miguel Taboada taboada.miguel@inta.gov.ar; Roberto Casas robertoraulcasas@gmail.com; Gabriel Vázquez Amabile gvazquez@crea.org.ar; Jorge Gvozdenovich gvozdenovich.jorge@inta.gov.ar; Federico Fritz ffritz@crea.org.ar; Juan Gaitán gaitan.juan@inta.gov.ar; Patricia Carfagno carfagno.patricia@inta.gov.ar; María Fabiana Navarro navarroderau.maria@inta.gov.ar; Pablo Guelperin aepablo@gmail.com; Juan Cruz Colazo colazo.juan@inta.gov.ar

CIENCIA Y TÉCNICA

“EL MAGS G20 es una vidriera para el AGRO ARGENTINO”

La afirmación es de Juan Balbín, presidente del INTA, y resume la importancia que tiene para el país el encuentro de líderes científicos agrícolas (MACS) que sesionará en San Salvador de Jujuy a fines de mayo. Anticipa el marco de temas para tratar y el lugar del instituto, con responsabilidad en organizar y presidir los debates.

POR MARIO MIGLIORATI
FOTOGRAFÍA MERCEDES DO EYO

Durante este año la Argentina ejercerá la presidencia del G20, el mecanismo de cooperación económica y financiera que reúne a gobiernos de naciones industrializadas y en desarrollo, donde el INTA tiene el compromiso de presidir y organizar la próxima cumbre de los líderes en ciencia y técnica de los principales organismos de los países parte.

Con la necesidad de priorizar la sustentabilidad de los sistemas agropecuarios y con una agenda relacionada con una de las tres prioridades definidas por la presidencia argentina para el G20 2018: un futuro alimentario sostenible (las otras dos son: el futuro del trabajo e infraestructura para el desarrollo), a fines de mayo se reunirán los jefes científicos agrícolas (MACS, por sus siglas en inglés) en San Salvador de Jujuy.

“El INTA será anfitrión y responsable del séptimo encuentro”, inicia la charla Juan Balbín. Lo que surja, como visión del MACS, tendrá “continuidad y trascendencia en el encuentro de ministros y de líderes del G20”, aclara y admite: “Así

sucedió en Alemania el año pasado, de donde se retoman y se dan continuidad a los temas y así será en Japón —organizador del MACS 2019—, donde lo que se acuerde en Argentina será insumo”.

Dentro de los organismos que integran el Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación nacional, el INTA se presenta como el responsable en el tema agro y tendrá la vicepresidencia, mientras que la presidencia recaerá en la figura del jefe de gabinete del Ministerio de Agroindustria.

En diálogo con Revista RIA, acompañado por Norma Pensel, coordinadora nacional de Investigación y Desarrollo, y Martín Irurueta, integrante de la Coordinación (ambos participantes por INTA de las anteriores ediciones de MACS), sostiene que “uno de los temas propuestos está en la salud de los suelos”. Un recurso clave y eslabón para la seguridad alimentaria y el desarrollo productivo, por cuanto satisfacer las necesidades nutricionales de las poblaciones futuras requiere una manera sostenible de aumentar la productividad agrícola.

“Su preservación resulta crucial para el desarrollo sostenible y para garantizar la provisión de alimentos”, reconoce Balbín en torno al tema. La salud de los suelos preocupa a escala global y es donde la ciencia y la tecnología agrícola juegan un papel importante.

La antesala a lo que sucederá en Jujuy son los acuerdos alcanzados en la reunión de Alemania. Se debatieron temas con propuestas a ministros en torno a la seguridad alimentaria y el agua, el fomento de la sostenibilidad y la promoción de la innovación donde, además, en la reunión de líderes, tuvo eco dar forma a un mundo interconectado. Con relevancia desde el MACS en el acceso abierto de datos dentro del sector agroalimentario.

El séptimo MACS proporcionará un ámbito de información y contribuciones sobre desafíos emergentes y temas que pueden abordarse en futuras iniciativas, con el objetivo general de apoyar sistemas alimentarios sostenibles y resilientes en el futuro.

POSICIÓN PAÍS

¿Cuál es la posición que asume el país en el séptimo MACS G20, a través de la representación que asume el INTA en la organización del encuentro?

Juan Balbín: en lo referente al G20, a nivel país representa una importante oportunidad ya que es la primera vez que somos sede, hecho no menor que debe traducirse en la posibilidad de alcanzar una mayor visibilidad y conexión con el resto de los países miembros.

El MACS “representa una oportunidad para debatir sobre temas de la agenda internacional”
(Juan Balbín).



Mariano Bosch -vicepresidente-, Juan Balbín -presidente-, y Norma Pensel -coordinadora nacional de Investigación y Desarrollo.

En este contexto, durante el 2018, la Argentina es una vidriera donde el agro representa un sector importante como todo el conjunto que integra la agroindustria, por lo que vemos una oportunidad. Dentro de esa vidriera, que contiene al agro, el INTA se presenta como uno de los actores relevantes en todo lo que significa en la actualidad, no solo por la articulación tecnológica, sino también porque integra la investigación y el desarrollo aplicado con la extensión y transferencia. Desde ese punto de vista, representa una oportunidad para debatir sobre temas de la agenda internacional.

En esa línea, el presidente del INTA sostiene que formar parte del MACS G20, en el capítulo que corresponde a la reunión de los jefes científicos agrícolas, es relevante y “es donde se establecen lineamientos que impactan sobre las políticas en investigación y desarrollo de los países participantes”.

NO SOLO DECIR

Al respecto, ¿qué temas serán retomados del evento de Alemania del año pasado, y qué nuevos temas serán propuestos?

J.B.: hay un trabajo enfocado en transmitir una forma de producir, donde aparecen los suelos productivos vistos

desde un enfoque distinto al que está acostumbrado el mundo. Por lo cual, estos debates nos brindan una perspectiva que va más allá de las problemáticas que se han discutido en ediciones anteriores donde, además, nuestro país pondrá sobre la mesa algunos temas que son de su interés.

En ese aspecto, los suelos son pensados como la base de la producción y cómo, la salud de estos, aporta a la seguridad alimentaria; pero, también, aquí entran enfoques referidos al ambiente.

Para los países como Brasil y Argentina, los únicos latinoamericanos miembros y a los que se suma Chile como invitado, este nuevo orden en el debate junto con otros 16 estados y la Unión Europea (Ver: Países Miembros), que representan el 85 % del producto bruto interno de la economía mundial, permite desde el MACS reconocer múltiples iniciativas en distintos niveles orientadas para mejorar la seguridad alimentaria y la productividad agrícola de manera sostenible. Un espacio que permite tomar debida nota de las presentaciones en términos de orientación de decisiones y creación de capacidades en la aplicación del conocimiento y la tecnología.

Estos debates enmarcados en un contexto global se generan en ámbitos donde “reconocemos las oportunidades de colaboración global sobre un trabajo

crítico junto con los estados miembro y las organizaciones internacionales participantes”, precisa Balbín.

Estos aportes se plasman en un documento al final del encuentro que es elevado como insumo a la reunión de ministros en el área de agricultura. “Será en ese encuentro de ministros donde se definirá si apoyarán políticas que ayuden a desarrollar los temas”, refiere Norma Pensel, quien agrega: “El MACS es una oportunidad para la ciencia y la tecnología ligadas al agro” para que, más allá de las instituciones, “trate estos temas como oportunidades y desafíos”. Los que se cristalizarán si cuentan “con el apoyo de las políticas”, enfatiza.

En ese orden, “es el desafío”, dice Balbín, para quien hay un trabajo centrado

**En el MACS
“reconocemos las
oportunidades de
colaboración global sobre
un trabajo crítico junto
con los estados miembro
y las organizaciones
internacionales
participantes”
(Juan Balbín).**



Martín Irurueta junto a Pensel y Balbín durante la entrevista de RIA.



Desde una posición país es un espacio donde “se discuten herramientas que hacen viables los temas en término de políticas” (Martín Irurueta).

Es preciso reconocer “las capacidades de los miembros para brindar soluciones y saber cómo hacerlo” (Norma Pensel).

“en cómo esas sugerencias que se hacen desde ciencia y técnica pasan a ser una política pública”.

PROBLEMÁTICAS GLOBALES

Hay una posición global que enmarca los temas, aunque resulta necesario preguntar acerca del lugar de las necesidades locales. Al respecto, ¿cómo se vinculan, en ese amplio registro de intereses y de actores, las problemáticas del país?

J.B.: entendemos, tal como pasó en Alemania, con la propuesta del tema para la reducción de pérdida y desperdicio de alimentarios, si es tomado por el MACS y, posteriormente, por los ministros, que se transforma en una política global que ayuda a la competitividad y sostenibilidad de los países. La que repercute en los miembros del G20 como en el resto de los países.

Desde una posición país es un espacio donde “se discuten herramientas que hacen viables los temas en término de políticas”, expresa Martín Irurueta. Además, trascendente en cuanto a “que son esas mismas herramientas las que operativizan los ministros”, respalda.

De las reuniones de MACS surgen iniciativas como son las plataformas de colaboración. Un caso reciente responde al uso de datos abiertos para la agricultura, en cuanto a sus aplicaciones y usos. “Orientada –agrega Irurueta– a compartir la información sobre prácticas y sistemas de producción”. Otro eje donde se centraliza el interés es la resistencia bacte-

riana a los antibióticos, el cual ya ha sido propuesto para la reunión de ministros.

De acuerdo a los entrevistados, el incremento en la aparición de cepas resistentes a los antibióticos plantea un serio reto a la comunidad científica, lo que acarrea importantes consecuencias tanto para la salud pública como para las actividades agropecuarias.

Apoyados en el conocimiento que genera el INTA junto con otras instituciones locales e internacionales, el abuso y la mala administración de antibióticos en sistemas agropecuarios de producción intensiva aparecen entre las principales causas de este problema. Un orden en el debate donde “la voluntad política es necesaria para hacerle frente”, menciona Pensel.

CUADRO DE SITUACIÓN

Más allá de las propuestas, ¿qué demanda el MACS a los países miembros en temas, por ejemplo, de resistencia antibacteriana?

J.B.: a ciencia y técnica lo obliga a tener tecnologías alternativas a los antibióticos. La misma realidad nos muestra que la resistencia a los antimicrobianos es un problema realmente grave en América Latina y en el mundo. Desde organismos como el INTA promovemos acciones para minimizar los efectos de la aparición y propagación de bacterias resistentes, y este aporte se logra con buenas prácticas de manejo.

Discusiones en este orden, sobre los usos de antibióticos en sistemas agro-



pecuarios intensivos, ya que producto de estas prácticas las bacterias multirresistentes resultan en una amenaza mundial y cada vez hay más reportes sobre productos que dejan de ser efectivos, es donde transitan los debates del MACS que generan las políticas que tiene el objetivo de impactar en la producción y la salud animal y humana.

Ciencia y técnica tiene que ofrecer una alternativa, de ahí que el tema vuelva. Y, desde el punto de vista del INTA, nos orienta en las líneas de investigación y nos señala las tendencias futuras.

No es solo una discusión de temas. Supone proponer y propiciar el futuro en cuanto a cómo incrementar la productividad de los suelos sin impactar negativamente en el medio ambiente. Para ello es preciso reconocer *“las capacidades de los miembros para brindar soluciones y saber cómo hacerlo”*, subraya Pensel, aunque considera: *“No es suficiente con mantener esta discusión en agro”*.

Por caso, comenta que las reuniones de ministros (hay 11 áreas de trabajo, una de las cuales corresponde a Agricultura) son necesariamente un ámbito de articulación, o, como lo indica el G20 en su presentación, de *“trabajo mancomunado”*. Un ejercicio que permite llegar con acuerdos de políticas como, por ejemplo, es el tema de bacterias resistentes con el Área de Salud; y llegar así al ámbito de la Cumbre de Líderes para que las promuevan y asignen los fondos necesarios.

En ese sentido, si en Jujuy se hablará del tema suelos *“hay que establecer desde lo económico los costos y bene-*

Encuentro en la altura

Los representantes científicos se reunirán en la capital jujeña con el objetivo de debatir y conformar un informe de progreso sobre las actividades relacionadas con MACS. Previamente, participarán de un recorrido que incluye visitas técnicas durante el primer día y que iniciarán en Posta de Hornillos, un paraje a 2.300 m s. n. m. en plena Quebrada de Humahuaca. *“El desafío es mostrarles a los jefes científicos agrícolas que el INTA tiene amplias capacidades para la generación, construcción y transferencia de tecnología a través de sus actividades de investigación y extensión”*, destaca Irurueta.

En ese sentido, desde el INTA se proyecta una primera jornada para que los jefes científicos agrícolas tomen contacto con rodeos de llamas —provenientes de Abra Pampa— con el fin de que conozcan diversos aspectos en los que se trabaja desde la institución, entre otras actividades científicas y técnicas. El foco estará puesto en los procesos productivos hasta llegar a los desarrollos científicos del INTA, como el alcanzado en nanoanticuerpos de camélidos que dieron lugar a Rotadial. El primer kit de diagnóstico basado en nanoanticuerpos VHH para detectar y combatir la infección por Rotavirus (RV), la principal causa de la diarrea neonatal.

Esto será en el marco de la recorrida a las Salinas Grandes, el salar de 212 km² y límite de las provincias de Salta y Jujuy, y que continuará en la ciudad de Purmamarca. A tan solo 16 km de esa localidad, visitarán el Instituto de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Pequeña Agricultura Familiar (IPAF) NOA, donde conocerán las capacidades de la institución en investigación y extensión. *“Será una oportunidad para entrar en diálogo con productores de quinua, elaboradores de productos regionales y de hilados, y con un itinerario que incluye parcelas de cultivos andinos y de transición agroecológica”*, explica Irurueta.

También, se incluirá el parque de energías renovables. Allí se asiste a más de 1.000 agricultores familiares en lo referente a sistemas de captación en manantiales, vegas y pequeños cursos de agua para uso agropecuario, entre otros. Las recorridas darán el marco de introducción para los debates en Hornillos, donde el MACS sesionará durante dos días.

La agenda arranca a fines de mayo con el MACS y seguirá con la reunión de ministros de agricultura que se realizará en julio en Buenos Aires. Las conclusiones de esos encuentros serán insumos de la Cumbre de Líderes proyectada entre el 30 de noviembre y el 1 de diciembre en Buenos Aires.

ficos en el corto, mediano y largo plazo, como para entender que en lo inmediato tendrá costos, pero, con una visión a 20 años, será: producir o no producir”, remarca Pensel.

Es una *“manera de reorientar los planes de investigación y los fondos que se destinan”*, observa Balbín, para explicar que: *“En la medida que se priorizan, las demandas de investigación van alineados a estos temas”*. Y reconocer que

En esta construcción
“mundial y global,
somos un actor que
interactúa con un rol
claro y en un contexto
de importancia
para el país”
(Juan Balbín)

como país carecemos de esta dinámica, no así en países donde las inversiones en investigación son importantes y donde esta posición adquiere peso. A su entender, los temas “*marcan la agenda científica y su construcción no empieza ni termina en Argentina, ya lleva seis períodos y continuará en Japón el próximo año*”.

ESCENARIO GLOBAL

¿Qué sucede con temas que ya están instalados en otras agendas como la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático?

J.B.: hay un tratamiento y abordaje más acotado. En el último MACS se trató el tema de distintas estrategias para la adaptación de especies vegetales resistentes a salinidad o al estrés calórico. Las referencias están incluidas en el orden del tema y no se trabaja sobre los acuerdos preexistentes como el Acuerdo de París en Cambio Climático. El orden acordado es trabajar sobre la mitigación de los efectos y no sobre las fuentes o causas.

Es el cumplimiento de las políticas de Horizonte 2020 (el programa que financia proyectos de investigación e innovación de diversas áreas temáticas en el contexto europeo) quien alinea a los países. Por eso, “*cuando sale una recomendación del G20, esta tiene su impacto en cuanto a los compromisos por asumir ya que está alineada con los objetivos de Horizonte 2020*”, explica Pensel.

Así lo plantean en cuanto a financiamiento, duración de los proyectos y objetivos orientados en investigación básica, desarrollo de tecnologías, proyectos de demostración, líneas piloto de fabricación, innovación social, transferencia de tecnología, pruebas de concepto, normalización, apoyo a las compras públicas precomerciales, capital riesgo y sistema de garantías.

“*Desde la Unión Europea hay una orientación de fondos para los temas que se priorizan en el MACS*”, comenta Irurueta, pero aclara: “*No es un tema que se pone en discusión en las reuniones, aunque sabemos que a los países le sirve para orientar el financiamiento*”.

El INTA propone la organización del MACS en un contexto donde “*es parte del entorno, parte de un engranaje que es la Argentina y protagonista de discusiones de las que antes costaba más*

Países miembros

El G20 está integrado por 19 países y la Unión Europea. En conjunto, representan el 85 % del producto bruto global, dos tercios de la población mundial y el 75 % del comercio internacional.

Este año le toca a la Argentina, por ser quien preside el foro, elegir otros países invitados. En esa elección propuso a Chile y Holanda.

Los países que presiden organizaciones regionales como la Unión Africana, la Nueva Asociación para el Desarrollo de África y la Asociación de Naciones del Sudeste Asiático son invitados regulares del foro. En esta oportunidad, estos grupos regionales están representados por Ruanda, Singapur y Senegal, respectivamente. La comunidad del Caribe (CARICOM) también fue invitada por la Argentina y estará representada por Jamaica.

Los 19 países son Alemania, Arabia Saudita, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Corea del Sur, Estados Unidos, Francia, India, Indonesia, Italia, Japón, México, Rusia, Reino Unido, Sudáfrica y Turquía. En tanto, España es un invitado permanente de las reuniones del G20.

El MACS cuenta con la participación de instituciones internacionales de investigación agrícola, organizaciones e iniciativas de cooperación internacional, como: FAO, CABI, GFAR, GODAN, GEOGLAM, GRA, ILRI, Iniciativa del trigo, Iniciativa “4per1000” y OCDE, entre otras.



participar o se generaban en otros ámbitos”, resalta Balbín. En esta construcción “mundial y global, somos un actor que interactúa con un rol claro y en un contexto de importancia para el país”, indica y afirma: “el MACS G20 es una vidriera para el agro argentino”.

Más información: Juan Balbín presidencia@inta.gob.ar; Norma Pensel pensel.norma@inta.gob.ar; Martín Irurueta irurueta.martin@inta.gob.ar

Uso de subproductos de planta de algodón como fuente de fibra en dietas de engorde a corral

ARROQUY, J.I.^{1,2,3}; LOPEZ-FERNANDEZ, C.J.²; LOPEZ, A.³

RESUMEN

Los residuos de cosecha del cultivo de algodón disponibles en el norte argentino son una fuente alternativa de fibra larga (FL) para el reemplazo de forraje voluminoso de mayor costo (ej., heno de alfalfa o ensilajes de gramíneas) en dietas de alta concentración energética. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la sustitución de una fuente de FL, heno de alfalfa, por subproducto de planta de algodón (SPA) sobre el aumento medio diario (AMD), el consumo diario de materia seca (CMS) y la conversión (CMS/AMD) en dietas de engorde a corral. Se utilizaron 104 animales (Cruza Braford; 220 ± 4 kg PV) asignados al azar a 12 corrales (8 o 9 animales/corral) durante 68 días. El experimento se dividió en dos etapas de evaluación: adaptación (días 0 a 19), y terminación (días 20 a 68). Los tratamientos (4) consistieron en el reemplazo de heno de alfalfa (12,9% PB, 65,5% FDN) por SPA (7,2% PB, 71,4% FDN): 100% Alfalfa (SPA₀), 66% Alfalfa: 33% SPA (SPA₃₃); 33% Alfalfa: 66% SPA (SPA₆₇); y 100% SPA (SPA₁₀₀). El peso promedio inicial (día 0; $P = 0,92$), al final de la adaptación (día 19; $P = 0,26$) y final (día 68; $P = 0,37$) no difirió significativamente entre tratamientos. El AMD ($P > 0,43$), CMS ($P \geq 0,23$) y CMS/AMD ($P = > 0,50$) no fueron afectados por los tratamientos en ninguna de las etapas evaluadas. Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que el reemplazo total o parcial de heno de alfalfa de mediana calidad por SPA en dietas altas en concentrados (>89%) no afecta negativamente la ganancia de peso ni la conversión de la ración.

Palabras clave: engorde corral, fibra larga, subproducto algodón, concentrado, conversión, bovinos para carne.

ABSTRACT

Cotton fibre co-products available in northern Argentina are a source of effective fiber to replace high cost roughage (e.i., alfalfa hay or silage or grasses) in finishing diets. This experiment was conducted to evaluate the effect of replacing roughage sources (alfalfa hay) by cotton plant byproduct (SPA) on average daily gain (ADG), dry matter intake (DMI) and feed efficiency (DMI/ADG) in feedlot diets. One hundred and four (220 ± 4 kg PV) were assigned to 12 pens (8 or 9 head/per pens) for 68 days on feed. The experiment was divided in two feeding periods: adaptation (days 0 to 19) and finishing (days 20 to 68). Treatments consisted of replacing the roughage portion of the diet (alfalfa hay; 12.9% CP, 65.5% NDF) by SPA (7.2% CP, 71.4% NDF): 100% alfalfa (SPA₀); 66% alfalfa: 33% SPA (SPA₃₃); 33% alfalfa: 66% SPA (SPA₆₇); and 100% SPA (SPA₁₀₀). Initial (day 0; $P = 0.92$), adaptation (day 19; $P = 0.26$) and final (day 68; $P = 0.37$) average live weight did not significantly differ among treatments. Moreover, ADG ($P > 0.43$), DMI ($P > 0.23$) and DMI/ADG ($P > 0.50$) were not affected by treatments for both feeding periods. Results show that total or partial replacement of alfalfa roughage by SPA in high concentrate diets (>89%) do not adversely affect live weight gain and feed efficiency.

Keywords: feedlot, effective fiber, cotton byproduct, concentrate, feed efficiency, beef cattle.

¹CITSE-CONICET, Ruta 9 Km 1125, Villa El Zanjón, Santiago del Estero, Argentina. Correo electrónico: arroquy.jose@inta.gov.ar

²Facultad de Agronomía y Agroindustrias – UNSE, Belgrano (s) 1912, 4200 Santiago del Estero, Argentina.

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Santiago del Estero, Jujuy 850, 4200 Santiago del Estero, Argentina.

Introducción

En general, los corrales de engorde utilizan dietas de terminación ricas en granos para maximizar la conversión y la productividad animal. Sin embargo, varios estudios (Shain *et al.*, 1999; Galyean y Defoor, 2003; Pritchard *et al.*, 2003) sugieren la necesidad de incluir niveles mínimos de forraje voluminoso o “fibra larga” (FL) en raciones con alto contenido de granos para prevenir problemas de acidosis ruminal y estimular el consumo de energía. Kreikemeier *et al.* (1990) y Shain *et al.* (1999) reportaron incrementos del consumo de materia seca (MS) del 5 a 10% ante la inclusión en la dieta de FL entre 10 y 15% en comparación con aquellas totalmente concentradas. Sin embargo, un consumo de proporciones excesivas de FL en raciones de terminación disminuye la densidad de la energía, el consumo, y la productividad animal (Mertens, 1997). Galyean y Gleghorn (2001) y Galyean y Defoor (2003) sugieren que los requerimientos de FL para maximizar la productividad animal oscilan entre el 3 y 15% de la dieta (base seca).

La efectividad de los forrajes voluminosos, fuentes de FL, para estabilizar el pH ruminal y estimular el consumo de energía, depende sus las características físicas y químicas, la concentración de fibra detergente neutro (FDN), la densidad volumétrica, y la capacidad tampón del material (Defoor *et al.*, 2002). El principal factor asociado con la efectividad del forraje voluminoso para dietas concentradas es el contenido de FDN y el tamaño de partículas.

Swingle (1986) reportó que el reemplazo de heno de alfalfa por paja de trigo en dietas para novillos en crecimiento (65 y 80% de concentrado) y terminación (90% de concentrado) no afectó la respuesta productiva. Los autores especularon que la paja de trigo podría haber afectado la cinética de fermentación y la tasa de pasaje de otros componentes de la dieta en el rumen, cambiando el sitio y extensión de digestión. En un ensayo posterior, Moore *et al.* (1990) demostraron que la sustitución de heno de alfalfa por paja de trigo o cascarilla de algodón, usados como forrajes en dietas mixtas, afectó en forma diferencial la tasa de pasaje y de digestión del grano de sorgo. La paja de trigo estimuló la rumia y la digestibilidad de la fibra de la alfalfa y del sorgo, no siendo afectadas por la cascarilla de algodón. Theurer *et al.* (1999) compararon el heno de alfalfa, cascarilla de algodón, y paja de trigo como fuentes de forraje voluminoso en dietas de terminación. Los autores concluyeron que las fuentes de forraje de baja calidad – cascarilla de algodón y paja de trigo– ejercen mayor efecto

“fibra” que los forrajes de mayor calidad (alfalfa) atribuido a diferencias en el contenido de FDN. Resultados similares fueron reportados por Defoor *et al.* (2002) en un estudio realizado con vaquillonas en terminación utilizando cascarilla de algodón (2,5, 5,9, y 12,5% de MS) y un control con 12,5% de heno de alfalfa. Otro aspecto que influye sobre la efectividad de los forrajes voluminosos es la densidad volumétrica (g/L), a menor densidad volumétrica mayor es la efectividad de la fuente de forraje. Por ejemplo, el silo de sorgo sudanense (base MS) tiene aproximadamente el doble de la densidad del heno de alfalfa. La cascarilla de algodón tiene una densidad volumétrica similar al heno de alfalfa (140 g/L y 142 g/L respectivamente). Estos resultados indican que la FL, como la cascarilla de algodón, debe ser incluida en las raciones altamente energéticas en menores concentraciones en relación con las dietas que poseen como fracción fibrosa una fuente de fibra de alta calidad.

El cultivo de algodón genera una elevada cantidad de subproductos potencialmente utilizables en la alimentación de rumiantes, que se ha incrementado recientemente por uso de la práctica de siembra en surcos estrechos (24% vs. 39% por tonelada de algodón bruto para siembra convencional y surco estrecho, respectivamente). El subproducto de planta de algodón (SPA) es el que mayor incremento experimenta mediante este cambio en el sistema de siembra. El SPA consiste de hojas, brácteas, carpelos, tallos, linter, semillas, y arena o suelo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sustitución de heno de alfalfa por SPA sobre el consumo, la ganancia de peso y la conversión en bovinos alimentados con dietas concentradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del estudio

El trabajo se realizó en el Campo Experimental “La María” (INTA EEA Santiago del Estero, Argentina). Para este estudio se utilizaron 52 novillos y 52 vaquillonas (cruza Braford) distribuidos en 12 corrales balanceados por sexo (ej., 50% machos: 50% hembras dentro de cada corral) y agrupados en tres grupos de peso inicial similar (4 corrales por grupo): alto = 242,8 ± 4,1 kg PV, medio = 229,5 ± 2,4 kg PV, y bajo = 187,6 ± 1,4 kg PV (± desvío estándar). La duración total del ensayo fue de 68 días, dividido en dos fases de evaluación: fase de adaptación (día 0 a 19) y fase de terminación (día 20 a 68). Antes de comenzar con el ensayo los animales fueron tratados con antiparasitarios y

	MS	PB ¹	FDN ²	FDA ³
Semilla de algodón	895	247	520	289
Subproducto de planta de algodón	868	72	714	530
Maíz partido	867	100	135	37
Heno de alfalfa	871	129	655	395
Urea	990	2810	-	-

Tabla 1. Composición química de los ingredientes de la dieta (g/kg materia seca, MS).

¹Proteína bruta. ²Fibra detergente neutro. ³Fibra detergente ácido.

vitaminas A, D, E (Ivermectina 3,15%; Vetanco S.A., Vicente López, Buenos Aires). También se inyectó un complejo mineral (Yodacalcico B12-D; Chinfield S.A.).

Los tratamientos se generaron mediante el reemplazo de heno de alfalfa de mediana calidad como fuente de fibra larga por subproducto de planta de algodón (SPA): 10,44% Alfalfa (SPA₀), 6,93% Alfalfa: 3,41% SPA (SPA₃₃); 3,41% Alfalfa: 6,93% SPA (SPA₆₇); y 10,35% SPA (SPA₁₀₀). La composición química de los ingredientes utilizados en las cuatro raciones se presenta en la tabla 1.

Las dietas se formularon para ser isoenergéticas, isoproteicas y de similares contenidos de fracción fibrosa de acuerdo a los requerimientos nutricionales establecidos por el NRC (1996) de bovinos para carne (tabla 2).

Las raciones fueron suministradas dos veces por día a las 9:00 y 14:00 h. El SPA se suministró sin procesamiento alguno, mientras que el heno de alfalfa fue molido utilizando un molino a martillos (diámetro de zaranda de 5 cm).

Los animales se sometieron a un período de adaptación a la dieta de 19 días. Desde el inicio del período de adapta-

ción se comenzó suministrando las raciones concentradas (c.a., 10% fibra larga), pero con oferta controlada. La oferta diaria se fue incrementando gradualmente hasta el día 19, y ajustándose mediante lectura de comedero hasta el final del ensayo (día 68). Los rechazos de la ración se cuantificaron mediante el uso de la lectura diaria de comedero, ajustado con una pesada semanal del remanente. Una porción semanal de los rechazos (por corral) fue secada en estufa de aire forzado a 55 °C. Con los rechazos colectados semanalmente, se realizó una muestra compuesta para el posterior análisis químico en laboratorio. El consumo diario de materia seca (CMS) y nutrientes se cuantificó mediante la diferencia entre la oferta diaria y los rechazos, ambos corregidos sobre el contenido de MS y nutrientes.

El peso vivo inicial y final se registró luego de 24 h de ayuno previo a la pesada, con excepción de la fase de adaptación (día 19) que se determinó el peso vivo de los animales sin ayuno previo, al cual se le aplicó un factor de corrección por desbaste del 4%. El aumento medio diario de peso vivo (AMD) se estimó con las diferencias de peso para cada período evaluado.

	Fuente de fibra larga en la dieta ¹			
	SPA ₀	SPA ₃₃	SPA ₆₇	SPA
Ingredientes, g/ kg MS				
Maíz partido	860,6	861,1	860,7	860,0
Semilla de algodón	17,2	17,2	17,2	17,2
Urea	6,5	7,0	7,5	8,1
Fuente de calcio ²	7,5	7,5	7,5	7,5
Cloruro de sodio	1,9	1,9	1,9	1,9
Núcleo vitamínico-mineral ³	1,9	1,9	1,9	1,9
Heno de Alfalfa	104,4	69,3	34,1	-
Subproductos de la planta de algodón	-	34,1	69,3	103,5
Composición química de las raciones				
Materia seca, g/kg MS	870	870	870	870
Proteína bruta, g/kg MS	122	121	121	120
Fibra detergente neutro, g/kg MS	193	195	197	199
FDN aportada por el voluminoso, g/kg MS	68	70	72	74
Fibra detergente ácido, g/kg MS	78	83	87	92
EM (Energía metabolizable) ⁴ , Mcal/kg MS	32	32	32	32
ENg ⁵ , Mcal/kg MS	15	15	15	15

Tabla 2. Proporción de ingredientes y composición química de las dietas.

¹Fuente de fibra larga (SPA = subproducto de planta de algodón), % en la dieta: SPA₀ = 10,44% Alfalfa, SPA₃₃ = 6,93% Alfalfa: 3,41% SPA; SPA₆₇ = 3,41% Alfalfa: 6,93% SPA; y SPA₁₀₀ = 10,35% MS SPA.

²Cal hidratada (Hidróxido de calcio).

³Núcleo vitamínico-mineral (composición: sulfato de cobre 2,20%, iodato de calcio 0,06%, carbonato de cobalto 0,021%; óxido de manganeso 10%, sulfato de zinc 10,8%, selenito de sodio 0,021%, sulfato ferroso 5,82%, carbonato de calcio 4%, monensina 10%).

⁴Estimada mediante la ecuación de Menke y Steingass (1988); EM (Mcal/kg MS = 3,5 - 0,035 x %FDA).

⁵ENg = energía neta para ganancia de peso vivo estimada según NRC (1996).

Con los registros de consumo corregidos por materia seca (CMS) y de aumento de peso vivo se calculó la conversión (CMS/AMD) sobre el CMS (kg) dividido por el AMD.

Análisis de laboratorio

Se determinó la composición química de cada ingrediente de la dieta ofrecida a través de procedimientos estandarizados utilizados en laboratorios de forrajes. Las muestras de alimento ofrecido y rechazado fueron secadas en estufa con ventilación forzada (55 °C) para la determinación de MS. Luego fueron molidas a 1 mm (molino número 4 Wiley, Thomas Scientific, Swedesboro, N.J.), y posteriormente secadas por 24 h a 105° para el cálculo del porcentaje de MS final. Para la determinación de proteína bruta (N total) se utilizó el procedimiento de Kjeldahl descrito por la AOAC (1980). El contenido de fibras (fibra detergente neutro, FDN; fibra detergente ácido, FDA) de los componentes de la dieta y de las muestras compuestas de remanentes por corral se determinaron con el analizador de fibra 220-ANKOM (ANKOM Technology, Fairport, N.Y.) usando el procedimiento reportado por Komarek (1993).

El contenido de energía metabolizable (EM, Mcal/kg MS) para cada ración fue estimado mediante la ecuación ajustada a mezclas de dietas altas en concentrados de Menke y Steingass (1988); $EM [Mcal/kg MS] = 3,5 - 0,035 \times \%FDA$. A su vez, la energía neta para ganancia de peso (ENg, Mcal/Kg MS) se determinó a partir de la EM utilizan-

do la ecuación sugerida por NRC de bovinos para carne (1996):

$$ENg (Mcal/kg) = 1,42 EM - 0,174 EM^2 + 0,0122 EM^3 - 1,65$$

Análisis estadístico

El diseño experimental fue en bloques (3), y la unidad experimental fue el corral. El consumo, el peso vivo, el aumento medio diario, y la conversión de alimento se analizó utilizando el procesador Mixed del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EE. UU.). Para el análisis estadístico de los parámetros de valor nutritivo de la dieta consumida se utilizaron medidas repetidas en el tiempo (fase 0-19 días vs. fase 20-68 días) utilizando proc. Mixed de SAS. Las medias de tratamientos se compararon utilizando el test de diferencias mínimas significativas (DMS, $P < 0,05$).

RESULTADOS

El peso promedio inicial (día 0; $P = 0,92$), al final de la etapa de adaptación (día 19; $P = 0,26$) y al terminar el ensayo (día 68; $P = 0,37$) no difirieron significativamente entre tratamientos (tabla 3). De igual manera, el AMD durante la fase de adaptación (día 0 a 19 = 968 ± 274 ; $P = 0,51$), terminación (día 19 a 68 = 1255 ± 149 ; $P = 0,67$), y promedio del ensayo (día 0 a 68 = 1176 ± 144 ; $P = 0,43$) no fueron afectados por los tratamientos.

	Fuente de fibra larga en la dieta ¹				EEM	Valor de P
	SPA0	SPA33	SPA67	SPA100		
Peso vivo, kg						
Día 0 (inicial)	220,7	219,0	219,7	220,7	3,48	0,92
Día 19	241,0	234,0	237,0	242,0	4,8	0,26
Día 68 (final)	305,3	291,3	297,7	305,3	10,5	0,37
Aumento medio diario, g/d						
Día 0 a 19	1060	793	907	1113	274	0,51
Día 20 a 68	1317	1173	1237	1293	149	0,67
Día 0 a 68	1247	1067	1147	1243	144	0,43
Consumo de MS, % PV/d						
Día 0 a 19	1,87	2,07	2,00	1,92	0,32	0,87
Día 20 a 68	3,15	2,89	3,25	3,00	0,19	0,23
Día 0 a 68	2,77	2,64	2,88	2,68	0,20	0,53
Conversion, kg/kg						
Día 0 a 19	4,86	7,05	5,78	4,67	2,04	0,51
Día 20 a 68	6,12	6,26	6,71	5,93	0,72	0,61
Día 0 a 68	5,69	6,28	6,46	5,52	0,83	0,50

Tabla 3. Efecto de la sustitución de heno de alfalfa por subproducto de planta de algodón (SPA) sobre la productividad animal y la conversión de la dieta.

¹ Fuente de fibra larga (SPA = subproducto de planta de algodón), % en dieta base MS: SPA0 = 10,44% Alfalfa, SPA33 = 6,93%, Alfalfa = 3,41% SPA; SPA67 = 3,41%, Alfalfa: 6,93% SPA; y SPA100 = 10,35% MS SPA.

	Fuente de fibra larga en la dieta ¹				Fase		Valor de P		
	SPA0	SPA33	SPA67	SPA100	d 0 a 19	d20-68	EEM	Fase	Dieta
PB², g/kg MS	124a ⁷	120b	121b	122ab	121	122	2	0,31	0,07
FDN³, g/kg MS	191	181	192	188	199a	176b	11	<0,01	0,29
FDNv⁴, g/kg MS	87b	93ab	91ab	95a	101a	83b	5	<0,01	0,08
FDA⁵, g/kg MS	88b	93ab	92ab	98a	98a	87b	6	<0,01	<0,05
EM⁶, Mcal/kg MS	3,19a	3,18ab	3,18ab	3,16b	3,16b	3,20a	0,02	<0,01	0,08
ENG⁷, Mcal/kg MS	1,51a	1,50ab	1,50ab	1,48b	1,48b	1,51a	0,01	<0,01	<0,05

Tabla 4. Efecto del reemplazo de alfalfa por subproducto de planta de algodón (SPA) sobre el valor nutritivo de la dieta consumida.

¹Fuente de fibra larga (SPA = subproducto de planta de algodón), % en dieta base MS: SPA0 = 10,44% Alfalfa, SPA33 = 6,93%, Alfalfa = 3,41% SPA; SPA67 = 3,41% Alfalfa: 6,93% SPA; y SPA100 = 10,35% MS SPA.

²Proteína bruta.

³Fibra detergente neutro.

⁴Fibra detergente neutro aportada por el volumen.

⁵Fibra detergente ácido.

⁶Energía metabolizable.

⁷Energía neta de ganancia de peso vivo.

⁸Medias con letras distintas entre columnas para dieta y fase difieren entre sí según DMS ($P < 0,05$).

La interacción dieta x día de alimentación no afectó el CMS ni la conversión (CMS/AMD), por lo tanto, se reportan los resultados promedio por dieta y etapa del estudio (día 0 a 19, día 19 a 68, y día 0 a 68; tabla 3). El CMS no difirió en el ciclo completo del ensayo ($P = 0,87$), las etapas del día 0 a 19 ($P = 0,23$) y del día 19 a 68 ($P = 0,53$) entre los cuatro tratamientos evaluados. El consumo medio expresado como % del PV fue $1,97 \pm 0,32$, $3,07 \pm 0,19$, $2,74 \pm 0,20$ (\pm EEM) para la etapa de adaptación, terminación, y el ciclo completo de engorde respectivamente.

De modo similar a lo ocurrido con el CMS y el AMD, la conversión CMS/AMD no difirió significativamente entre tratamientos en ninguna etapa y el ciclo completo del ensayo ($P > 0,50$). Las conversiones medias de la etapa de adaptación (día 0 a 19), terminación (día 19 a 68), y el ciclo completo (día 0 a 68) fueron $5,59 \pm 2,04$, $6,26 \pm 0,72$, y $5,99 \pm 0,83$ respectivamente.

La interacción etapa x dieta no fue estadísticamente significativa para ningún parámetro de calidad de la dieta consumida. El contenido de PB y FDN no difirió estadísticamente entre tratamientos ($P > 0,23$; tabla 4) para ninguna de las etapas de alimentación en estudio. Sin embargo, el contenido de PB promedio (dos etapas) tendió a ser mayor en SPA₀ que en SPA₃₃ y SPA₆₇ ($P = 0,07$), mientras que SPA₁₀₀ presentó valores intermedios.

Por el contrario, el contenido de FDA aumentó, y la energía neta de ganancia de peso (ENG) disminuyó en respuesta al reemplazo de alfalfa por subproducto de planta de algodón (de SPA₀ a SPA₁₀₀; $P < 0,05$; tabla 4). Una tendencia similar se observó en el porcentaje de FDN aportada por el voluminoso (FDNv) y el contenido de energía metabolizable (EM) de la dieta consumida ($P = 0,08$).

En la etapa de adaptación, el contenido de FDN, FDNv y FDA de la dieta consumida fue mayor que en la etapa de

terminación ($P < 0,01$; tabla 4), aunque el nivel de forraje voluminoso no fue significativamente mayor al de la dieta de terminación. En cambio, la EM y la ENG fueron mayores en la etapa de terminación. La concentración de PB no fue estadísticamente diferente entre etapas.

Aunque la concentración de FDA y FDNv aumentaron en respuesta al incremento en la inclusión de SPA en la fracción voluminosa de la dieta y que la ENG disminuyó, el consumo de FDNv y ENG fue similar entre tratamientos (tabla 4). Solo se observaron diferencias en el consumo de FDNv y ENG entre la etapa de adaptación y de terminación.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este experimento la sustitución parcial o total de heno de alfalfa por subproducto de la planta de algodón no afectó la performance animal, el consumo (MS, FDNv, y ENG) y la eficiencia de uso de la dieta con una ración de 89% de concentrado. Sin embargo, en este aspecto en la bibliografía se observan resultados variados en desempeño animal en respuesta a la inclusión SPA como fuente de fibra en dietas concentradas (Bartle *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1981; Defoor *et al.*, 2002; McCartor *et al.*, 1972; Theurer *et al.*, 1999). La inconstancia en la respuesta a la inclusión de SPA se debe a que el desempeño productivo y la eficiencia no solo dependen del tipo de fuente de fibra, sino también del nivel de inclusión de esta en la dieta. El contenido de forraje voluminoso recomendado para dietas concentradas oscila entre 4,5 y 13,5% (Galyean y Gleghorn, 2001), aunque está más relacionado con el contenido de FDN aportada por el volumen a la dieta total que con el nivel de inclusión de forraje voluminoso *per se* (Galyean y Defoor, 2003).

En este estudio, el AMD equivalente entre tratamientos es coincidente con resultados previos obtenidos en un es-

tudio similar realizado por Bartle *et al.* (1994) en dietas de alta energía. Defoor *et al.*, (2002) observaron que el consumo y la eficiencia fueron similares por el reemplazo de alfalfa por cascarilla de algodón. No obstante, en contraposición con nuestros resultados y los de Defoor *et al.* (2002), Bartle *et al.* (1994) observaron que los lotes donde la fuente de fibra larga de la ración fue SPA tuvieron mayor consumo y menor eficiencia de uso de la dieta que los alimentados con alfalfa como fuente de fibra larga. Guthrie *et al.* (1996) reemplazaron heno de alfalfa por cascarilla de algodón o heno de sorgo sudanés al 7,5% y al 15%. Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos con heno de alfalfa, en promedio, consumieron menos y ganaron menos peso por día que aquellas a las que se les ofreció cascarilla de algodón o heno de sorgo sudanés. Los autores sugieren que forrajes voluminosos más fibrosos podrían tener mayor capacidad para estimular el consumo de energía y reducir la acidosis que el heno de alfalfa.

En contraste con la respuesta en CMS observado en nuestro estudio, los trabajos sobre la sustitución de heno de alfalfa u otra fuente de fibra larga de buena calidad por cascarilla de algodón muestran en su mayoría un incremento del CMS (Defoor *et al.*, 2002; Theurer *et al.*, 1999; Bartle *et al.*, 1994). A diferencia de los trabajos previamente citados, el presente ensayo se diferencia en que el contenido de FDN de la cascarilla fue solo 5,9 puntos superior al de la alfalfa, generando dietas prácticamente iguales en el contenido de FDN (rango de concentración de FDN en dietas ofrecidas = 19,34 - 19,89%; tabla 2). La diferencia pequeña en el contenido de fibra entre forrajes voluminosos sumada, posiblemente, a la selección de la dieta por los animales en el comedero originó dietas consumidas muy similares en el contenido de FDN (rango de concentración de FDN en dietas consumidas = 18,1 - 19,2%; tabla 4).

Por una parte, la concentración de energía metabolizable de las dietas consumidas en los cuatro tratamientos fueron cercanas al límite inferior del rango óptimo (EM = 3,16 a 3,45) para maximizar el AMD y la conversión de alimento (Krehbiel *et al.*, 2006). Por otra parte, el consumo de ENg es congruente con niveles observados en otros estudios (Defoor *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 1990).

Defoor *et al.* (2002) sugieren que el CMS y de ENg se incrementa debido al aumento en el contenido de FDN de la dieta por la sustitución de alfalfa por cascarilla. En el presente estudio se observó un incremento de FDNv y FDA en la dieta consumida en respuesta a la sustitución total o parcial de alfalfa por cascarilla en la dieta. A pesar de que el incremento de la FDA en la dieta disminuyó la concentración de ENg dietaria, no se reflejó un menor consumo de ENg. Muchos factores influyen sobre el consumo de ENg, entre ellos, distintas fuentes de forraje voluminoso juegan un rol importante en dietas concentradas. Defoor *et al.* (2002) sugieren que un punto importante para valorizar una fuente de fibra larga se centra, además de su capacidad para aminorar los problemas de trastornos digestivos, en la capacidad que tiene para estimular el consumo de ENg. En este sentido, fuentes con mayor contenido de FDN son más efectivas para optimizar el consumo de ENg.

El consumo de ENg aumenta en respuesta al aporte de FDN proveniente del forraje voluminoso. Pese a la dilución de la concentración energética de la dieta, esto parece ser compensado o sobrecompensado. Por lo tanto, en dietas donde el consumo no está limitado por la regulación física (llenado), el animal tiene la posibilidad de consumir energía adicional mediante el agregado de niveles basales de fibra de forraje voluminoso antes de que los mecanismos quimioestáticos limiten el consumo (Owens *et al.*, 1998). En este sentido, en el presente estudio se observó que, aunque la concentración de ENg disminuyó y la FDNv aumentó por la sustitución de alfalfa por SPA, el CMS fue similar. Lo descrito por Owens *et al.* (1998) explica de algún modo estos resultados.

Un aspecto importante asociado con la fuente de fibra es que el incremento o el mantenimiento del consumo de ENg frente a diluciones de la dieta está mayormente asociado a un aumento de la tasa de pasaje (NRC, 1996). En este sentido cambios en la tasa de pasaje de los componentes dietarios alteran la magnitud de digestión en los distintos compartimientos del tracto digestivo (Owens *et al.*, 1998). Moore *et al.* (1990) evaluaron la tasa de pasaje en novillos fistulados de rumen alimentados con dietas con 65% de concentrado (base grano de sorgo) que contenían tres tratamientos de forraje voluminoso diferencial: 35% de heno de alfalfa, 35% de una mezcla de alfalfa con cascarilla de algodón (50% alfalfa: 50% cascarilla), o 35% de una mezcla de alfalfa con paja de trigo (50% alfalfa: 50% paja de trigo). El reemplazo de alfalfa por cascarilla de algodón incrementó el CMS y tendió a aumentar la tasa de pasaje del grano. Por lo tanto, pequeñas cantidades de forrajes voluminosos en dietas concentradas incrementan la tasa de pasaje del grano y del fluido ruminal (Goetsch y Owens, 1986), aunque cuando el nivel es excesivo el efecto puede ser el inverso (>50%, aumenta el tiempo de retención).

La FDN del forraje disminuye el tiempo de retención del grano provocando una reducción en su digestión a nivel ruminal, lo cual se traduce en menor producción y concentración de ácidos grasos volátiles ruminales. Como es conocido, los ácidos grasos volátiles (AGV) juegan un rol primordial en la regulación del consumo en rumiantes (Baile y Forbes, 1974), destacándose el propionato como uno de los AGV más importantes en la regulación de consumo. El cambio del sitio de digestión incrementa la disponibilidad de almidón en el intestino delgado y reduce la concentración de AGV en el rumen. Esto en parte desajustaría o demoraría la regulación del consumo por la reducción en la concentración ruminal de AGV permitiendo mayor consumo de energía que una dieta totalmente concentrada.

Finalmente, un aspecto poco considerado, pero que también podría influir en el sitio de digestión de la dieta es que la cascarilla de algodón contiene taninos y gossipol (aunque presente en niveles menores que en la semilla; Blasi y Drouillard, 2002). Los compuestos secundarios como los taninos y el gossipol pueden alterar la fermentación mediante un efecto directo sobre los microorganismos ruminales o mediante la formación de complejos con carbohidratos o proteínas (Molan *et al.*, 2001). En este sentido, se especula

que ciertos niveles de compuestos secundarios presentes en la fuente de forraje reducirían la producción de ácidos grasos volátiles, y de este modo estimularían el consumo de ENg en dietas concentradas.

A partir de los resultados obtenidos en este experimento se concluye que el reemplazo total o parcial del heno de alfalfa por subproductos fibrosos de algodón como fuente de fibra larga en dietas concentradas (>89%) no influye sobre la ganancia de peso y la eficiencia de uso de la ración.

BIBLIOGRAFÍA

- BAILE, C.A.; FORBES, J.M. 1974. Control of feed intake and regulation of energy balance in ruminants. *Physiol. Rev.* 54:160–214.
- BARTLE, S.J.; PRESTON, R.L., MILLER, M.F. 1994. Dietary energy source and density: Effects of roughage source, roughage equivalent, tallow level, and steer type on feedlot performance and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.* 72: 1943–1953.
- BLASI, D.; DROUILLARD, J., 2002. Cottonseed Feed Products for Beef Cattle, Composition and Feeding Value, Kansas State University.
- DEFOOR, P.J.; GALYEAN, M.L.; SALYER, G.B.; NUNNERY, G.A.; PARSONS, C.H. 2002. Effects of roughage source and concentration on intake and performance by finish heifers. *J. Anim. Sci.* 80:1395–1404.
- GALYEAN, M.L.; DEFOOR, P.J. 2003. Effects of roughage source and level on intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2): E8–E16.
- GALYEAN, M.L.; GLEGHORN, J.F. 2001. Summary of the 2000 Texas Tech University Consulting Nutritionist Survey. Burnett Center Internet Report 12:1–9.
- GILL, D.R.; OWENS, F.N.; MARTIN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; ZINN, R.A.; HILLIER, R.J. 1981. Roughage levels in feedlot rations. *Oklahoma Agric. Exp. Res. Rep.* MP-108–141.
- GOETSCH, A.L.; OWENS, F.N. 1986. Effects of dietary nitrogen level and ileal antibiotic administration on digestion and passage rates in beef heifers. I. high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 1986 62: 830–843.
- GUTHRIE, M.J.; GALYEAN, M.L.; MALCOM-CALLIS, K.J.; DUFF, G.C. 1996. Roughage source and level in beef cattle finishing diets. *Prof. Anim. Sci.* 12: 192–198.
- KOMAREK, A.R. 1993. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1): 250.
- KREHBIEL, C.R.; CRANSTON, J.J.; MCCURDY, M.P. 2006. An upper limit for caloric density of finishing diets. *J. Anim. Sci.* 84: E34–E49.
- KREIKEMEIER, K.K.; HARMON, D.L.; BRANDT Jr., R.T.; NAGARAJA, T.G.; COCHRAN, R.C. 1990. Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: Effects of dietary roughage and feed intake on finishing steer performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 68: 2130–2141
- MCCARTOR, M.M.; ENGLAND, M.W.; HEFLEY, H.M. 1972. Effect of various roughages in high concentrate beef cattle diets on animal performance and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.* 34:142–145.
- MENKE, K.H.; STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28: 7–55.
- MERTENS, D.R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci* 80:1463–1481.
- MOLAN, A. L.; ATTWOOD, G.T.; MIN, B.R.; McNABB, W.C. 2001. The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Can. J. Microbiol.* 47: 626–633.
- MOORE, J.A.; POORE, M.H.; SWINGLE, R.S. 1990. Influence of roughage source on kinetics of digestion and passage, and on calculated extents of ruminal digestion in beef steers fed 65% concentrated diets. *J. Anim. Sci.* 68:3412–3420.
- OWENS, F.N.; SECRIST, D.S.; HILL, W.J.; GILL, D.R. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76: 275–286.
- PRITCHARD, R.H.; BRUNS, K.W. 2003. Controlling variation in feed intake trough bunk management. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2): E133–E1238.
- SHAIN, D.H.; STOCK, R.A; KLOPFENSTEIN, T.J.; HEROLD, D.W. 1999. The effect of forage source and particle size on finishing yearling steer performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 77:1082–1092.
- SWINGLE, R.S. 1986. Substitution of weight straw for alfalfa hay in diet for feedlot steer and lactating cow. *Proc. Southwest Nutr. Conf., Univ. of Arizona*, 35–45 pp.
- THEURER, C.B.; SWINGLE, R.S.; WANDERLEY, R.C.; KATTING, R.M.; URIAS, A.; GHENNIWA, G. 1999. Sorghum grain flake density and source of roughage in feedlot cattle diets. *J. Anim. Sci.* 77: 1066–1073.
- XIONG, Y.; BARTLE, S.J.; PRESTON, R.L. 1991. Density of steam-flaked sorghum grain, roughage level, and feeding regimen for feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 69: 1707–1718.

Estimación de biomasa aérea de *Grevillea robusta* A. implantada en la provincia de Misiones, Argentina

BARTH, S.R.¹; BOCA, T.²; GIMÉNEZ, A.M.³; JOSEAU, M.J.⁴; GAUCHAT, M.E.¹; FASSOLA, H. E.¹

RESUMEN

El ecosistema forestal es potencialmente un importante sumidero de carbono por ello es relevante poder cuantificarlo. Una buena aproximación es la obtenida a través del conocimiento de su biomasa. El presente trabajo se realizó con datos provenientes de una plantación de *Grevillea robusta* ubicada en Posadas, Misiones, Argentina. El objetivo fue la generación de modelos de estimación de la biomasa aérea a través de diferentes técnicas aditivas de estimación. Se generaron modelos para cada compartimento (hojas, ramas, corteza, fuste) y para la biomasa aérea total. Para ello se consideró el principio de aditividad mediante modelos estadísticos de ajustes simultáneos. Se evaluaron modelos que consideraban como variables predictoras al diámetro a altura de pecho (dap) y altura total (h). La adición de esta última variable aumentó la proporción de variación explicada para la biomasa aérea de *Grevillea robusta* aunque esto fue prácticamente imperceptible, con una disminución del error estándar. En la validación contra una muestra independiente, la biomasa total en este caso presentó un error 8,9% menor al que se dio en el modelo de una sola variable predictor. El mejor resultado se obtuvo con modelos con transformación logarítmica de variables. Al ser altura total una medida de mayor dificultad de obtención, se procedió a ajustar en forma alternativa un modelo con dap como única variable predictor.

Palabras clave: modelos aditivos, mínimos cuadrados ordinarios, regresiones aparentemente no relacionadas, biomasa arbórea.

ABSTRACT

The forest ecosystem is a potentially significant carbon pool, so it is important for it to be quantifiable. A good approximation is obtained through the knowledge of its biomass. This work was prepared based on data taken from a Grevillea robusta plantation in Posadas, Misiones, Argentina. The goal was to generate aboveground biomass estimation models through different additive estimation techniques. Models were built for each part of a tree (leaves, branches, bark and stem) and for the total aboveground biomass. For that

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Montecarlo, Av. El Libertador 2472. C.P. 3384. Montecarlo. Misiones. Argentina. Correo electrónico: barth.sara@inta.gob.ar; gauchat.maria@inta.gob.ar; fassola.hugo@inta.gob.ar

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Gerencia de control de gestión. Buenos Aires. Argentina. Correo electrónico: boca.teresa@inta.gob.ar

³Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Santiago del Estero. Argentina. Correo electrónico: amig@unse.edu.ar

⁴Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Félix Aldo Marrone 746. Ciudad Universitaria. CC 509. (5000). Córdoba. Argentina. Correo electrónico: jajoseau@agro.unc.edu.ar

Recibido 17 de septiembre de 2016 // Aceptado 30 de marzo de 2017 // Publicado online 20 de marzo de 2018

purpose, the additive principle was considered through statistical models with simultaneous adjustments. The models assessed were those included dbh (diameter at breast height) and total height (h) as predictor variables. The addition of this last variable increased the proportion of explained variance for *Grevillea robusta* biomass although this was practically imperceptible. The validation contrast against independent sample, the total biomass showed an error of 8,9 % lower than the single-variable predictive model. The best result were obtained from models with logarithmic transformation of the variables. As total height is harder to measure, an alternative model using only dbh as a variable was adjusted.

Keywords: additive models, ordinary least squares, seemingly unrelated regressions, tree biomass.

INTRODUCCIÓN

Un mejor conocimiento del potencial de los productos maderables obtenidos de la masa forestal interesa tanto desde el punto de vista económico como ambiental. La importancia de las estimaciones de volúmenes de biomasa para el manejo de recursos maderables y no maderables es reconocida para mejorar la planificación, la gestión sostenible y el seguimiento de cambios en las existencias de carbono almacenado en las forestaciones. La estimación de la biomasa forestal es importante en el marco de la política mundial de mitigación de los efectos del cambio climático. En vinculación a procesos surgidos a partir del protocolo de Kioto y períodos posteriores, las acciones encaradas implican la aplicación de tecnologías y medidas que tiendan a una reducción de emisión de gases de efecto invernadero y la mejora en los sumideros de estos (bosques nativos e implantados, mares, entre otros). La adaptación al cambio climático no debe considerar solamente cómo reducir la vulnerabilidad frente a los impactos negativos, sino también cómo beneficiarse de los positivos. Las medidas de adaptación deben enfocarse a corto y a largo plazo, e incluir componentes de manejo ambiental, de planeación y de manejo de desastres. Es sobre ello que cobra importancia una silvicultura y un manejo forestal adecuados (Paladinic *et al.*, 2009; Mc Kinley *et al.*, 2011).

Se define a la biomasa como la masa de material o tejidos vegetales, expresada en término del peso seco de los distintos compartimentos de la masa forestal (Coombs *et al.*, 1988). La biomasa es ampliamente empleada como indicador del efecto de factores externos sobre la planta y la productividad del rodal (luz, humedad y manejo silvícola: tales como densidad de plantación, poda y raleo, entre otros). Mediciones a nivel individual como dap y h permiten estimar la biomasa forestal a través de ecuaciones alométricas desarrolladas a partir de métodos destructivos y pesaje de los distintos componentes vegetales para la obtención de su peso seco (Eamus *et al.*, 2000; Zianis y Mencuccini, 2004; Zianis *et al.*, 2005 y 2011). Si bien este proceso inicialmente conlleva un elevado costo, es esencial a fin de proporcionar las bases indispensables para la aplicación a mayor escala (grandes superficies) a través, por ejemplo, de técnicas de teledetección (Goetz *et al.*, 2009; Houghton *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista biológico es importante que un modelo de predicción de biomasa arbórea total garantice la aditividad de todos sus componentes (Boca *et al.*, 2011; Carvalho, 2003). Desde el punto de vista estadístico la biomasa de los componentes en forma individual (hojas, ramas, fuste, corteza) suelen estar altamente correlacionados, lo cual dificulta la modelización aditiva simultánea con métodos tradicionales. En 1962 Zellner publicó el método SUR (seemingly unrelated regression) como una generalización del modelo lineal que se compone de varias funciones en el que cada ecuación es válida por sí misma y puede o no ser estimada por separado, por lo que el sistema se llama "aparentemente no relacionado". Los términos de error estarán correlacionados si se ajusta cada ecuación por separado empleando el método de mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Si bien las estimaciones son consistentes, no son tan eficientes como a través del método SUR, que trabaja con mínimos cuadrados generalizados factibles con una forma específica de la matriz varianza-covarianza. En el caso que nos ocupa, cuando las ecuaciones presentan el mismo conjunto de variables regresoras, el método SUR es recomendable. A fin de aplicar estas técnicas en la modelización de la biomasa es de utilidad el paquete Systemfit del software R publicado por Henningsen y Hamann (2007) que permite el ajuste de sistemas de ecuaciones lineales en forma simultánea y aditiva.

El objetivo del presente trabajo fue obtener modelos de estimación de biomasa aérea (hojas, ramas, fuste, corteza y biomasa total) a través de técnicas estadísticas que garanticen la aditividad de los componentes de biomasa aérea y compararlos con los modelos tradicionalmente empleados en el área de biometría forestal. Por una parte, si bien, dada su importancia, al estudiar almacenamiento de carbono sería de interés considerar también a la biomasa subterránea, esta no fue tomada en cuenta en el presente trabajo por cuestiones operativas y económicas que dificultan su estudio (Guerra *et al.*, 2005; Gárate y Blanco, 2013). Por otra parte, al no ser extraída la biomasa de raíces en el aprovechamiento de nuestra masa forestal, las raíces no son priorizadas en el presente estudio ya que al permanecer en el suelo no se genera una pérdida de nutrientes al sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra estuvo conformada por árboles de *Grevillea robusta* extraídos de un ensayo de densidades iniciales de plantación instalado en Posadas, Misiones, Argentina. Según Cabrera (1976), dicha zona corresponde con la región fitogeográfica de la provincia Paranaense (Dominio Amazónico) distrito de los campos (extensos pastizales en el sur de la provincia de Misiones y NE de la provincia de Corrientes). Los suelos derivan de la meteorización de la roca basáltica y son arcillosos en todo su perfil. El clima según la clasificación de Köppen es de tipo Cfa, macrotérmico, constantemente húmedo y subtropical (Rodríguez *et al.*, 2004). La precipitación media anual en Posadas durante el período 1994-2012 fue de 1866 mm. La temperatura media en el mismo período fue de 22,2 °C (Datos INTA Centro Regional Misiones, estación meteorológica Zaimán).

Se trabajó según la metodología propuesta por Köhl *et al.* (2006) realizando un muestreo destructivo. Se empleó un muestreo aleatorio estratificado, apeando 6 individuos por cada densidad de plantación, tomando 2 ejemplares por estrato (dominante, codominante y suprimido). Las densidades de plantación consideradas fueron 1500, 750, 375 y 162 árboles por hectárea. Cada tratamiento constó de 4 parcelas de forma cuadrada, 4 x 4 filas con dos filas de bordura perimetral y un tamaño variable según el espaciamiento adoptado. Al momento de la corta la plantación tenía 18 años.

La biomasa se obtuvo por el desarme total de los árboles (apeo, desrame y defoliado), realizándose a campo el pesaje del total de hojas y ramas. Una muestra del material de hojas y ramas fue secada a 70 °C ± 2-3 °C en laboratorio con el fin de estimar la biomasa de los distintos compartimentos (Fassola *et al.*, 2010; Schlegel *et al.*, 2000). Para ello, se realizó el pesaje de las muestras en fresco (a campo) y en seco (laboratorio) para la obtención de la relación que permita determinar la biomasa de cada árbol. La biomasa de fuste se obtuvo a partir de su volumen y determinaciones de su densidad básica en distintas porciones del árbol. Para el cálculo de la densidad se emplearon discos provenientes de la base de cada troza considerada, de los cuales se obtuvieron probetas cúbicas de 2 cm de lado extraídas de listones de un largo equivalente al diámetro de los discos (IRAM 9544, 1973). La densidad básica (*db*) se calculó como: $db = Pa/Vh$, donde *Pa* es el peso anhidro y *Vh* es el volumen de la probeta al contenido de humedad máximo. El volumen de las probetas se calculó a través del principio de Arquímedes. El peso anhidro de probetas se obtuvo por pesaje tras secado en estufa hasta peso constante a una temperatura de 103 ± 2 °C. La biomasa de corteza se estableció a partir de la relación entre el porcentaje de peso de este compartimento y el porcentaje del peso de la sección correspondiente del fuste previamente determinado (Martiarena *et al.*, 2011).

Se analizó la correlación entre la biomasa, las dimensiones de los individuos y la densidad de plantación (tratamiento). La correlación fue menor entre biomasa total por hectárea y densidad de plantación (0,53) que entre dicha

biomasa y dap (0,88), en ambos casos a un p-valor de 0,0001. Al no presentarse diferencias altamente significativas en biomasa total entre tratamientos, con excepción al de menor espaciamiento (Barth *et al.*, 2016), se ajustó un solo modelo de biomasa para todas las densidades de plantación.

Los modelos ajustados de forma simultánea para cada componente fueron previamente seleccionados entre los reportados comúnmente en la literatura (Burkhart, 2012) (tabla 1). Las variables explicativas fueron el diámetro a 1,30 m (dap) expresado en cm y altura del árbol (h) en m; los rangos de la muestra de trabajo y de validación son presentados en la tabla 2. La muestra de validación provino de un ensayo de intensidad y oportunidad de raleo de 14 años (Crechi *et al.*, 2008). A fin de equiparar las condiciones de manejo a las de la muestra de ajuste, en la validación se emplearon los datos del tratamiento testigo, sin raleo. Dicho ensayo tenía 3 repeticiones por tratamiento. La muestra destructiva de validación para estudio de biomasa estuvo compuesta por 12 individuos seleccionados al azar. Para este último procedimiento el error se calculó como $((\text{valor observado} - \text{valor estimado})/\text{valor observado}) * 100$.

Los componentes de biomasa estudiados (variable dependiente Y) fueron: biomasa de hojas, biomasa de ramas, biomasa de corteza, biomasa del fuste y biomasa total, todas expresadas en kilogramos por individuo. Los valores máximos, mínimos y promedios de las variables descriptoras de los datos considerados en el ajuste de modelos y en la validación se presentan en la tabla 3. Se aplicaron transformaciones logarítmicas de las variables dependientes e independientes para lograr la homogeneidad de las varianzas y para linealizar los modelos. Una vez realizadas las estimaciones se seleccionó aquel modelo que mejor se ajustaba para cada componente de biomasa en función de la significancia de los estimadores, los valores de R² ajustado (coeficiente de determinación ajustado) y del MSE (error cuadrático medio).

Modelo	Ecuación
1	$(y) = \beta_{01} + \beta_{11} * \ln(\text{dap}) + \varepsilon$
2	$(y) = \beta_{02} + \beta_{12} * \ln(\text{dap}) + \beta_{22} * \ln(h) + \varepsilon$
3	$\ln(y) = \beta_{03} + \beta_{13} * \ln(\text{dap}) + \beta_{23} * \ln(\text{dap}^2 * h) + \varepsilon$
4	$\ln(y) = \beta_{04} + \beta_{14} * \ln(\text{dap}^2 * h) + \varepsilon$

Tabla 1. Modelos evaluados para estimación de los distintos componentes de biomasa.

	Valores descriptivos de las variables predictoras empleadas en el ajuste de los modelos		Valores descriptivos de las variables predictoras empleadas en la muestra de validación	
	dap (cm)	h (m)	dap (cm)	h (m)
promedio	21,40	16,56	26,55	19,35
mínimo	11,50	8,00	17,43	16,99
máximo	40,00	21,25	34,60	20,51

Tabla 2. Valores promedios, mínimos y máximos de dap y altura total observados.

Compartimento	Valores descriptivos de las variables de respuesta empleadas en el ajuste de los modelos			Valores descriptivos de las variables de respuesta empleadas en la muestra de validación		
	promedio	mínimo	máximo	promedio	mínimo	máximo
Biomasa hojas	12,02	1,43	29,19	5,41	1,59	8,74
Biomasa ramas	56,88	5,06	198,72	31,21	8,91	54,47
Biomasa corteza	26,52	3,81	66,50	16,59	7,82	22,30
Biomasa fuste	198,72	29,91	470,21	167,17	73,88	234,09

Tabla 3. Estadísticas descriptivas de los componentes de biomasa (kg).

En una segunda etapa se procedió al ajuste simultáneo de todos los componentes de biomasa bajo un sistema de ecuaciones que puede representarse en forma matricial según [1]:

$$Y = X\beta + \varepsilon \tag{1}$$

Donde,

Y= la matriz de p variables de respuesta dependientes,

X= la matriz de incidencia para cada variable independiente,

β = vector de efectos para estimar,

ε = el vector de errores aleatorios y se asume que su distribución es normal multivariada ($0, \Sigma \otimes I_{(N)}$).

Zellner (1962) formuló las regresiones aparentemente no relacionadas (SUR), como p ecuaciones de regresión, con posibles correlaciones entre los términos de error de estas. El modelo SUR se explicitó según el sistema matricial [2]:

$$E(\hat{Y}) = \begin{bmatrix} \hat{y}_{(b \text{ foliar})} \\ \hat{y}_{(b r)} \\ \hat{y}_{(b c)} \\ \hat{y}_{(b f)} \\ \hat{y}_{(b t)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_{(b \text{ foliar})} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & X_{(b r)} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & X_{(b c)} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & X_{(b f)} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & X_{(b t)} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} \beta_{(b \text{ foliar})} \\ \beta_{(b r)} \\ \beta_{(b c)} \\ \beta_{(b f)} \\ \beta_{(b t)} \end{bmatrix} = D * B \tag{2}$$

El vector de coeficientes se estimó utilizando la fórmula [3].

$$\hat{B} = [D'Q^{-1}D][D'Q^{-1}D] \tag{3}$$

Donde Q es la matriz de ponderación basada en las covarianzas de las Y variables, según la ecuación [4]. D es la matriz de incidencia (a cuyos elementos anteriormente se mencionó como X) y B es el vector de coeficientes a estimar (β).

$$Q = \hat{\Sigma} \otimes I_N \tag{4}$$

Los elementos de la matriz $\hat{\Sigma}$ de la ecuación [4] se calcularon como [5].

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{(N - df^*)} y' [I_N - H_i] [I_N - H_j] y_j \tag{5}$$

Donde, $H_j = X_j(X_j'X_j)^{-1}X_j'$. Como puede verse los modelos SUR son una aplicación particular de los modelos lineales generalizados.

Ajuste por transformación. Por último, dadas las transformaciones logarítmicas aplicadas, se estimó un factor de corrección según la ecuación [6] con el objetivo de eliminar la asimetría en la distribución que se produce en el proceso de transformación inversa, que se da al utilizar la transformación logarítmica (Meyer, 1941). Dicho factor de corrección se aplica a los resultados obtenidos con el empleo del modelo.

$$K = e^{\left(\frac{\sigma^2}{2}\right)} \tag{6}$$

Donde, K: coeficiente de corrección de la discrepancia y σ^2 : varianza.

Los cálculos se realizaron en un entorno R (R Development Core Team, 2012), aplicando las funciones de los paquetes Systemfit (Henningsen y Hamann, 2007) y nlme (Pinheiro *et al.*, 2011). Como criterio de selección se empleó el coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustado) y el error estándar (MSE) de los modelos ajustados para cada compartimento. A los fines de comprobar si el modelo elegido era adecuado, se contrastaron los valores de biomasa observados versus los predichos determinándose el error porcentual y se efectuó el test de regresión lineal entre valores de biomasa observados y predichos mediante la expresión: $Y=a+b*X$. En este test si el modelo es bueno, la regresión coincide con la bisectriz del primer cuadrante, contrastándose mediante la prueba de F con un nivel de significación $\alpha=0,05$, la hipótesis nula de que el intercepto

es = 0 y la pendiente = 1 en forma simultánea (Huang *et al.*, 2003). Finalmente se evaluó la validez de los modelos con datos disponibles de una muestra independiente.

RESULTADOS

Si bien los datos empleados en este trabajo provinieron de un ensayo de densidad de plantación, la biomasa resultó estar más correlacionada a variables dendrométricas del árbol individual ($r=0,9$) que a la densidad de plantación en sí ($r=0,3$). Esto permitió incluir a todos los arboles provenientes de distintos tratamientos en el ajuste de parámetros de un solo modelo de predicción de biomasa independientemente de la densidad de plantación.

En la figura 1 se ilustra la relación entre la variable independiente diámetro a altura de pecho (dap) y altura total (h) y las

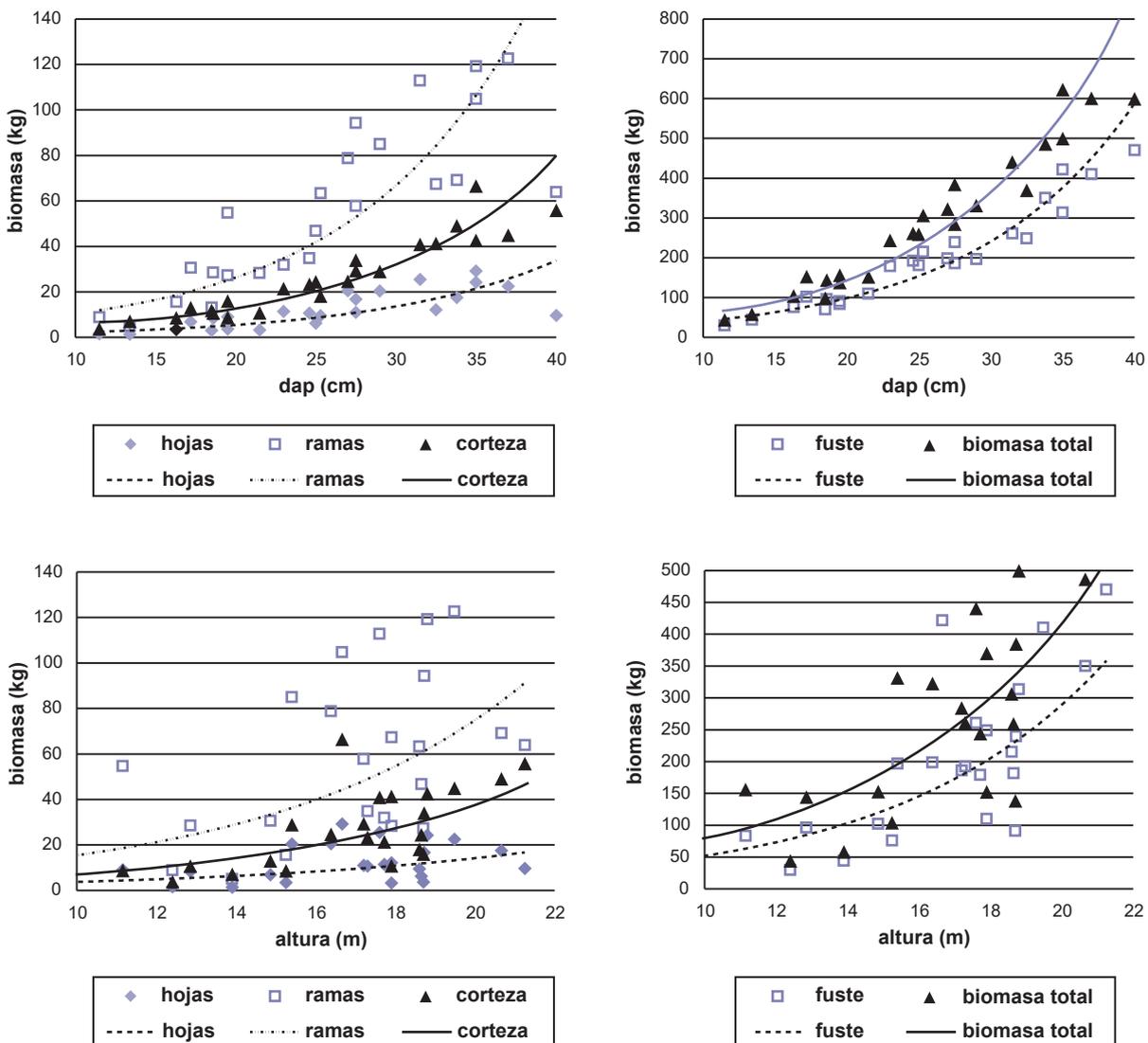


Figura 1. Relación entre el diámetro a la altura del pecho y altura total con la biomasa foliar, biomasa de ramas, biomasa de corteza, biomasa de fuste y biomasa total. Las líneas ilustran la tendencia de las relaciones consideradas.

variables dependientes: biomasa foliar, de ramas, de corteza y de fuste. El dap es una variable que explica satisfactoriamente la variabilidad de la biomasa en diferentes compartimentos del árbol, como así también, las variables dasométricas que muestran el estado del rodal (Zianis y Mencuccini, 2005; Saint-André *et al.*, 2005; Cole y Ewel, 2006; Ferrere *et al.*, 2008).

Las correlaciones analizadas fueron aceptables, no obstante en la biomasa de ramas y fuste en relación con la altura total la asociación fue de menor intensidad. En el ajuste de modelos independientes para cada compartimento de biomasa (tabla 4), el modelo 2 fue el de mejor desempeño en corteza y fuste y el modelo 3 en hojas y ramas.

Seleccionado el modelo más adecuado para la estimación de biomasa por cada compartimento se procedió al ajuste simultáneo de los modelos. Bajo el ajuste simultáneo de los modelos seleccionados los valores de los parámetros resultaron similares en todos los compartimentos al comparar los estimadores OLS y SUR (tabla 5), excepto para biomasa total donde con estimadores SUR se obtiene un menor valor de MSE en comparación con el hallado con estimadores OLS. Además se registró una reducción en los intervalos de confianza al utilizar la metodología SUR respecto a OLS (tabla 5). Boca *et al.* (2011) estudiando la predicción de biomasa aérea para *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, si bien encontraron una leve reducción de los intervalos de confianza de los estimadores SUR respecto a los OLS, encontraron que estos últimos garantizaban las propiedades de aditividad de los componentes de la biomasa.

Como los modelos están afectados por la transformación logarítmica, en el proceso de validación, los errores de estos fueron calculados en sus unidades originales a través del coeficiente de discrepancia logarítmica de Meyer cuyos valores se presentan en tabla 6.

Calculado el error del ajuste del modelo seleccionado (contrastando contra sus propios datos) se concluyó que su desempeño es muy aceptable, con las pendientes de las rectas ajustadas entre valores observados y predichos cercanas a 1 (figura 2). En este procedimiento, biomasa foliar arrojó un error promedio de -2,72%; biomasa de ramas, -3,45%; biomasa de corteza, 0,36%, biomasa de fuste, 0,16% y biomasa total presentó un error de 0,03%. Pudo observarse además en la representación de los modelos de la figura 2 que las pendientes son cercanas a 1 y los interceptos cercanos a cero, hecho que comprobó la bondad de ajuste alcanzada.

Validados los modelos ajustados contra la muestra independiente la biomasa foliar arrojó un error promedio de -13,95%, la biomasa de ramas -1,63%, la biomasa de corteza -11,41%, la biomasa de fuste 12,67% y la biomasa total presentó un error de 1,01%.

Si bien los modelos que incorporan como variables predictoras tanto al dap y como a la *h* suelen ser los mejores (Brown *et al.*, 1989; Brown, 1997; Overman *et al.*, 1994; Araujo *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 1997) no siempre es posible aplicarlos con los datos disponibles. Los modelos de determinación de biomasa ajustados a partir del dap como única variable independiente tienen la ventaja de que

	$\hat{\beta}_0$	$\hat{\beta} \ln(\text{dap})$	$\hat{\beta} \ln(h)$	$\hat{\beta} \ln(\text{dap}^2 \cdot h)$	R ² ajustado	MSE	Modelo
ln(biomasa hojas)	-5,00	2,26			0,74	0,45	1
	-4,28	2,48	-0,51		0,75	0,46	2
	-8,40	4,10		-0,09	0,76	0,44	3*
	-0,55			0,09	0,63	0,54	4
ln(biomasa ramas)	-3,15	2,16			0,75	0,42	1
	-3,05	2,20	-0,07		0,75	0,42	2
	-5,14	3,24		-0,05	0,76	0,42	3*
	1,06			0,09	0,67	0,48	4
ln(biomasa corteza)	-3,91	2,18			0,93	0,20	1
	-4,17	2,10	0,18		0,94	0,20	2*
	-3,29	1,85		0,02	0,93	0,20	3
	0,24			0,10	0,90	0,24	4
ln (biomasa fuste)	-1,77	2,15			0,94	0,20	1
	-4,17	2,10	0,18		0,96	0,15	2*
	-3,29	1,85		0,02	0,93	0,20	3
	0,24			0,1	0,90	0,24	4

Tabla 4. Valores estimados de los distintos parámetros de los modelos propuestos para estimación de biomasa y sus coeficientes de ajuste.

*Modelo seleccionado.

Método	OLS						SUR						
	Compartimento	Coefficiente	LI	LS	rango	R ² ajustado	MSE	Coefficiente	LI	LS	rango	R ² ajustado	MSE
Biomasa foliar													
	β_0	-8,40	-13,27	-3,53	9,70	0,74	0,44	-7,33	-11,13	-3,53	7,60	0,74	0,44
	$\beta_1 \ln(\text{dap})$	4,10	1,59	6,62	5,00			3,52	1,63	5,41	3,80		
	$\beta_2 \ln(\text{dap}^2 \cdot \text{h})$	-0,08	-0,20	0,03	0,20			-0,05	-0,14	0,02	0,20		
Biomasa ramas													
	β_0	-5,14	-9,75	-0,54	9,20	0,74	0,42	-4,12	-7,20	-1,05	6,20	0,74	0,42
	$\beta_1 \ln(\text{dap})$	3,24	0,87	5,62	4,70			2,69	1,21	4,17	3,00		
	$\beta_2 \ln(\text{dap}^2 \cdot \text{h})$	-0,05	-0,16	0,06	0,20			-0,02	-0,09	0,40	0,50		
Biomasa corteza													
	β_0	-4,17	-5,28	-3,07	2,20	0,93	0,20	-4,21	-5,30	-3,11	2,20	0,93	0,20
	$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,10	1,76	2,45	0,70			2,09	1,76	2,43	0,70		
	$\beta_2 \ln(\text{h})$	0,18	-0,32	0,69	1,00			0,21	-0,30	0,71	1,00		
Biomasa fuste													
	β_0	-2,34	-3,10	-1,58	1,50	0,96	0,14	-2,36	-3,11	-1,61	1,50	0,96	0,14
	$\beta_1 \ln(\text{dap})$	1,97	1,74	2,21	0,50			1,97	1,73	2,20	0,50		
	$\beta_2 \ln(\text{h})$	0,41	0,06	0,76	0,70			0,4205	0,08	0,76	0,7		
Biomasa total													
	β_0	-1,74	-2,54	-0,94	1,60	0,96	0,42	-1,71	-2,44	-0,98	1,50	0,96	0,14
	$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,06	1,81	2,30	0,50			2,06	1,84	2,29	0,50		
	$\beta_2 \ln(\text{h})$	0,23	-0,14	0,60	0,70			0,21	-0,07	0,50	0,60		

Tabla 5. Valores estimados de los distintos parámetros para el mejor modelo seleccionado bajo métodos OLS y SUR en cada compartimento de biomasa aérea.

Componente de biomasa	Coefficiente de discrepancia logarítmica
Biomasa de hojas	1,1017
Biomasa de ramas	1,0922
Biomasa de corteza	1,0202
Biomasa de fuste	1,0098
Biomasa total	1,0098

Tabla 6. Coeficientes de discrepancia logarítmica de modelos de predicción de biomasa por compartimento.

la mayoría de los inventarios forestales incluyen la medición de dicha variable. Por este motivo, si bien la predicción presenta un mayor nivel de error, se presentan los valores obtenidos con dicho ajuste (tabla 7).

Se presenta tan solo el ajuste simultáneo de este modelo a través del método SUR ya que no se evidenciaron diferencias entre ambos procedimientos (SUR y OLS), con excepción del MSE de biomasa total que pasó de 0,45 (OLS)

a 0,15 (SUR). Esto puede deberse a una subparametrización del modelo al reducirse a una sola variable predictora.

Calculado el error de ajuste de los modelos (contrastando contra sus propios datos) se concluyó que su comportamiento es aceptable, las pendientes de las rectas ajustadas entre valores observados y predichos son cercanas a 1 (figura 3). Estimada a través de la función ajustada la biomasa foliar arrojó un error promedio de -8,59%, la biomasa de ramas -9,11%, la biomasa de corteza -3,88%, la biomasa de fuste -2,18% y la biomasa total presentó un error de 0,03%.

Validados los modelos ajustados contra la muestra independiente, la biomasa foliar presentó un error promedio de -16,67%, la biomasa de ramas -4,30%, la biomasa de corteza -7,34%, la biomasa de fuste 15,49% y la biomasa total mostró un error de 9,91%.

Realizada una comparación entre el modelo ajustado con las variables predictivas dap y altura versus el modelo con dap como única variable independiente, se recomienda el empleo del modelo 3 descrito en la tabla 1. En la aplicación de todos los modelos considerados debe tenerse en cuenta su empleo solo dentro del rango diamétrico considerado en el presente trabajo (tabla 2).

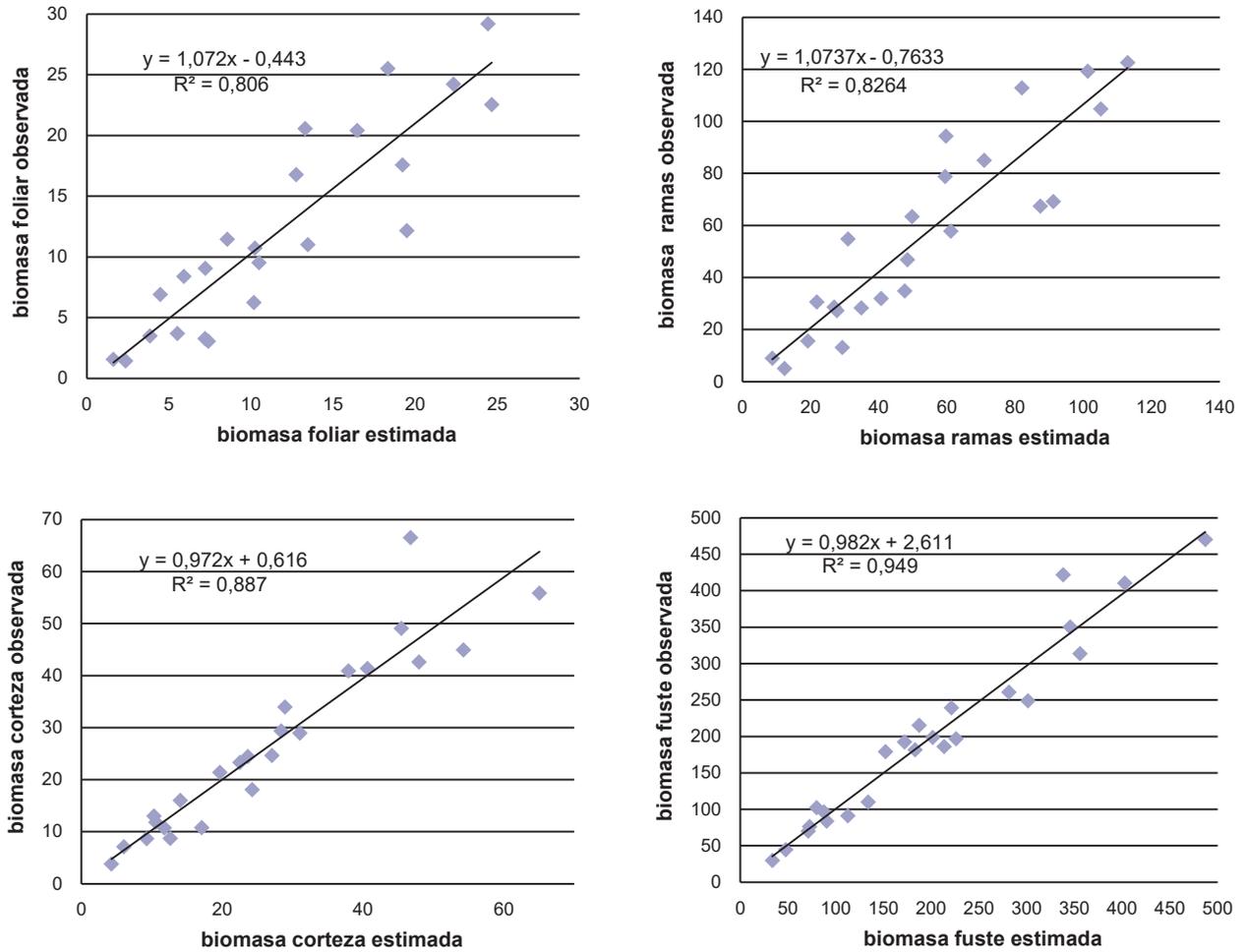


Figura 2. Valores de biomasa observados versus predichos.

Compartimento	Coefficiente	LI	LS	Discrepancia logarítmica	R ² ajustado	MSE
Biomasa foliar						
β_0	-5,00	-6,92	-3,08	1,10656	0,72	0,45
$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,26	1,66	2,86			
Biomasa ramas						
β_0	-3,15	-4,91	-1,40	1,09220	0,74	0,42
$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,16	1,62	2,71			
Biomasa corteza						
β_0	-3,91	-4,74	-3,09	1,02020	0,93	0,20
$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,18	1,93	2,44			
Biomasa fuste						
β_0	-1,77	-2,40	-1,13	1,01131	0,96	0,15
$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,15	1,95	2,35			
Biomasa total						
β_0	-1,41	-2,02	-0,79	1,00984	0,96	0,15
$\beta_1 \ln(\text{dap})$	2,16	1,96	2,35			

Tabla 7. Valores estimados para el modelo con dap como única variable predictora.

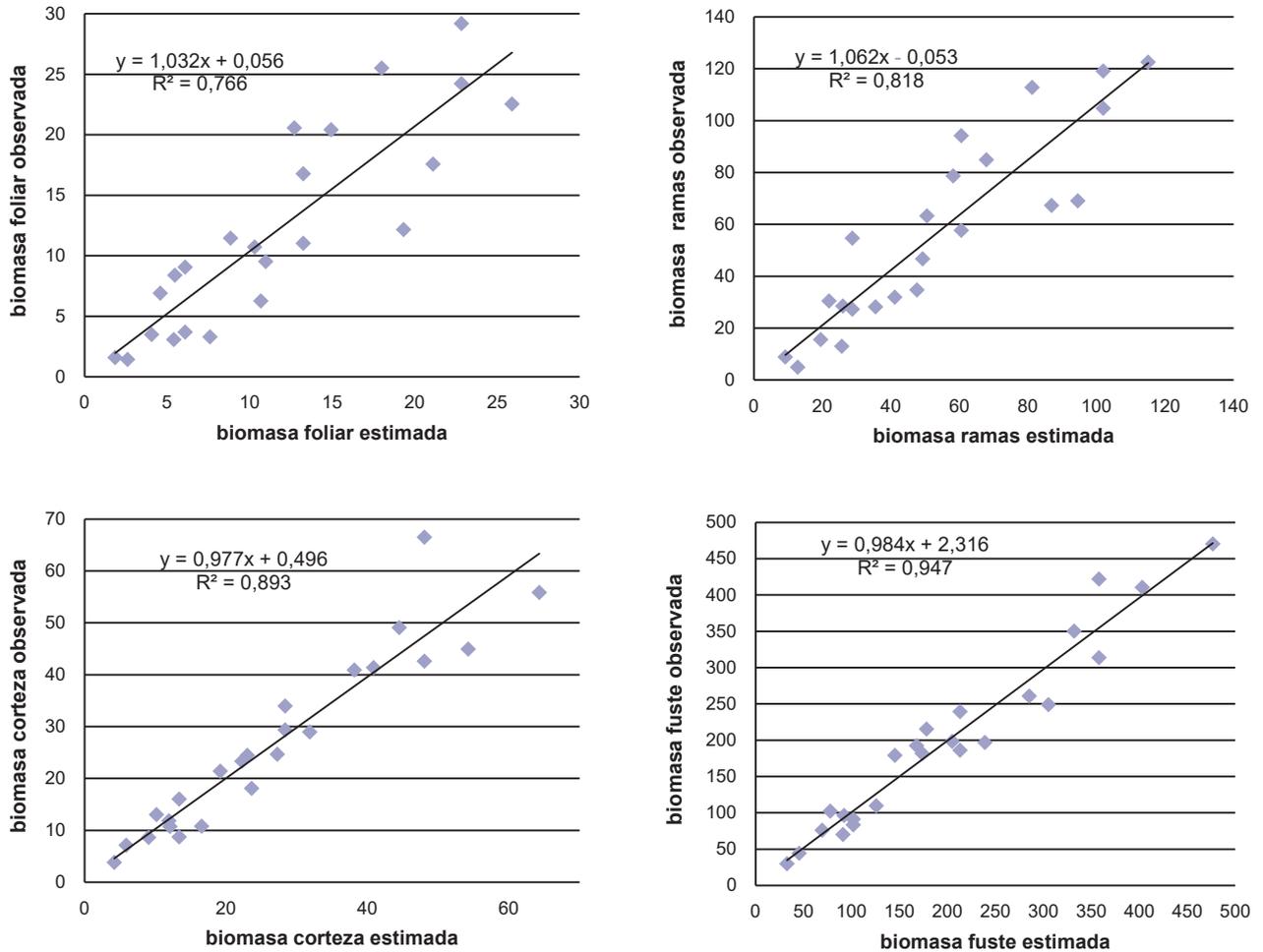


Figura 3. Valores de biomasa observados versus predichos sobre el modelo de mejor ajuste.

Variables predictoras	Biomasa				
	Hoja	Rama	Corteza	Fuste	Total
dap y altura	-13,95	-1,634	-11,41	12,67	1,01
dap	-16,67	-4,3	-7,34	15,49	9,91

Tabla 8. Errores de estimación calculados sobre la validación contra muestra independiente de modelos con una y dos variables predictoras (Valores expresados en porcentaje).

En coincidencia con lo encontrado por Russell *et al.* (2008) para *Pinus taeda*, y Boca *et al.* (2011) en *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, las estimaciones SUR mejoraron los resultados de las estimaciones OLS. En el presente trabajo, la mejora fue notable particularmente en la estimación de la biomasa total. Se buscó que los modelos cumplan con la lógica biológica, resultando eficientes las estimaciones de los parámetros, manteniendo la independencia y aditividad de los compartimentos de biomasa según lo recomendado por Carvalho y Parresol (2003).

Los resultados tienen aplicación directa en la determinación del potencial de una plantación de *Grevillea ro-*

busta para la producción de productos tradicionales y no tradicionales, incluyendo la producción de biomasa para la bioenergía. También pueden ser utilizados para construir los presupuestos de carbono y nutrientes en la evaluación de la sostenibilidad ambiental de diferentes métodos de manejo y cosecha.

CONCLUSIONES

Este estudio provee una serie de modelos para la estimación de la biomasa aérea total y de sus distintos componentes para rodales de *Grevillea robusta* A., especie de la

que no se dispone de información previa en este aspecto. Este conocimiento es de vital importancia como información de base en proyectos de cuantificación del carbono.

El mejor comportamiento para la estimación de la biomasa aérea se dio en los modelos linealizados que trabajaban con logaritmo natural del diámetro y la altura.

El uso del diámetro como única variable independiente en los modelos de biomasa simplifica la recolección de datos a campo. No obstante, las estimaciones mejoran significativamente con la incorporación de la altura como variable predictora.

La distribución de la biomasa en los individuos sigue el patrón de desarrollo que se encuentra en la bibliografía.

El análisis de la eficiencia de los modelos demostró que, si bien los datos provienen de una reducida región geográfica, en esta etapa es posible su empleo en cultivos de la provincia de Misiones, Argentina. Aunque los modelos obtenidos son fiables, es necesario ampliar la base de datos en cuanto a edades y distribución de sitios en el área de trabajo. Para futuros estudios de estimación de stock de carbono en el ecosistema los relevamientos deberían incluir la biomasa subterránea (raíz) y el carbono orgánico almacenado en la materia orgánica del suelo, así como de los demás estratos del sotobosque.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAUJO, T.M.; HIGUCHI, N.; CARVALHO JUNIOR, J. A. 1999. Comparison of formulae for biomass content determination in a tropical rain forest site in the state of Para, Brazil. *Forest Ecology and Management* 117:43–52.
- BARTH, S.R.; GIMÉNEZ, A.M.; JOSEAU, M.J.; GAUCHAT, M.E.; FASSOLA, H. 2016. Compartimentalización de la biomasa aérea de *Grevillea robusta* A. en función a la densidad inicial de plantación. *Revista Scientia Florestalis*. Brasil. (En prensa).
- BOCA, R.T.; FASSOLA, H.E.; CRECHI, E.H.; BARTH, S.R.; KELLER, A.E.; WINCK, R.A. 2011. Uso de estimadores SUR para predecir biomasa aérea de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* var. *Hondurensis*. Actas XVI Reunión Científica del Grupo Argentino de Bioestadística (GAB) Salta. Argentina. 10 pp.
- BROWN, S.; GILLESPIE, A.J.R.; LUGO, A.E. 1989. Biomass estimation methods for tropical forests with applications to forest inventory data. *For. Sci.* 35: 881–902.
- BROWN, S. 1997. Estimating biomass and biomass change of tropical forests. FAO Forestry paper N.º 134. FAO, Roma. 55 p.
- BURKHART, H.; TOMÉ, M. 2012. *Modeling Forest Trees and Stands*. Springer, xiv. 476 p.
- CARVALHO, J.P.; PARRESOL, B.R. 2003. Additivity in tree biomass components of Pyrenean oak (*Quercus pyrenaica* Willd.). *Forest Ecology and Management* 179:269–276.
- COLE, T.J.; EWEL, J.J. 2006. Allometric equations for four valuable tropical tree species. *Forest Ecology and Management* 229:351–360.
- CRECHI, E.; KELLER, A.; FASSOLA, H.; FERNÁNDEZ, R.; MOSCOVICH, F. 2008. Efectos de la intensidad de raleo sobre la producción en volumen de *Grevillea robusta* A. en el sur de Misiones, Argentina. 13.º Jornadas Técnicas, Forestales y Ambientales, Eldorado, Misiones. Facultad de Ciencias Forestales-UNaM. EEA Montecarlo INTA. 11 p.
- EAMUS, D.; MCGUINNESS, K.; BURROWS, W. 2000. Review of allometric relationships for estimating woody biomass for Queensland, the Northern Territory and Western Australia. National Carbon Accounting System. Technical Report 5 b. Australian Greenhouse Office, Canberra.
- FASSOLA, H.E.; CRECHI, E.H.; BARTH, S.R.; KELLER, A.E.; WINCK, R.A.; MARTIARENA, R.; VON WALLIS, A.; PINAZO, M.A.; KNEBEL, O. 2010. Modelos regionales de biomasa aérea de *Pinus taeda* para Misiones y NE de Corrientes, Argentina. XIV Jornadas Técnicas, Forestales y Ambientales, Eldorado, Misiones, Argentina. Facultad de Ciencias Forestales-UNaM; EEA Montecarlo-INTA. 11 p.
- FERRERE, P.; LUPI, A.; BOCA, T.R.; NAKAMA, V.; ALFIERI, A. 2008. Biomasa en plantaciones de *Eucalyptus viminalis* Labill. de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Ciencia Florestal*. (18) 3:291–305.
- GÁRATE, M.; BLANCO, J.A. 2013. Importancia de la caracterización de la biomasa de raíces en la simulación de ecosistemas forestales. *Revista Ecosistemas* 22(3):66–73. Doi: 10.7818/ECOS.2013.22-3.10
- GUERRA, J.; GAYOSO, J.; SCHLATTER, J.; NESPOLO, R. 2005. Análisis de la biomasa de raíces en diferentes tipos de bosques. *Avances en la evaluación de Pinus radiata* en Chile. *Revista Bosque* 26(1): 5–21.
- GOETZ, S.J.; BACCINI, A.; LAPORTE, N.; JOHNS, T.; WALKER, W.S.; KELLNDORFER, J.M. 2009. Mapping & monitoring carbon stocks with satellite observations: A comparison of methods. *Carbon Balance and Management*, 4(2). Doi: 10.1186/1750-0680-4-2
- HENNINGSEN, A.; HAMANN, J.D. 2007. Systemfit: A Package for Estimating Systems of Simultaneous Equations in R. *Journal of Statistical Software*. Vol. 23, Issue 4.
- HOUGHTON, R.A.; HALL, F.; GOETZ, S.J. 2009. Importance of biomass in the global carbon cycle. *Journal of Geophysical Research*, 114, Issue G2. Doi: 10.1029/2009JG000935.
- IRAM 9544. 1973. Norma para métodos de determinación de densidad aparente en maderas. Instituto Argentino de Racionalización de materiales. 10 p.
- MARTIARENA, R.; PINAZO, M.; VON WALLIS, A.; KNEBEL, O.; PAHR, N. 2011. Alternativas de manejo para la conservación de nutrientes en sistemas forestales en Misiones, Argentina. *Revista Ciencia del Suelo* 29(1): 39–48.
- MCKINLEY, D.C.; RYAN, M.C.; BIRDSEY, R.A.; GIARDINA, C.P.; HARMON, M.E.; HEATH, L.S.; HOUGHTON, R.A.; JACKSON, R.B.; MORRISON, J.F.; MURRAY, B.C.; PATAKI, D.E.; SKOG, K.E. 2011. A synthesis of current knowledge on forests and carbon storage in the United States. *Ecological Applications* 21:1902–1924. Doi: 10.1890/10-0697.1
- MEYER, H.A. 1944. Correction for a systematic error occurring in the application of the logarithmic volume equation. *Pennsylvania. Forest School Research*. Paper 7. 3 p.
- OVERMAN, J.P.M.; WITTE, H.J.L.; SALDARRIAGA, J.G. 1994. Evaluation of regression models for above ground biomass determination in Amazon rainforest. *Journal of Tropical Ecology*, 10: 207–218.
- PALADINIC, E.; VULETIC, D.; MARTINI, Y.; MARJANOVIĆ, H.; INDIR, K.S.; BENKO, M.; NOVOTNY, V. 2009. Forest biomass and sequestered carbon estimation according to main tree components on the forest stand scale. *Periodicum Biologorum*. (111) 4:459–466.
- PINHEIRO, J.; DOUGLAS, B.; DEBROY, S.; SARKAR, D. 2011. R Development Core Team, nlme: Linear and Nonlinear

Mixed Effects Models. R package version 3.1-102. (Disponible: <http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/> verificado: diciembre de 2014).

R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Austria. (Disponible: <http://www.R-project.org> verificado: noviembre de 2014).

SAINT-ANDRÉ, L.; M'BOU, A.T.; MABIALA, A.; MOUVONDY, W.; JOURDAN, C.; ROUPSARD, O.; DELEPORTE, P.; HAMEL, O.; NOUVELLON, Y. 2005. Age-related equations for above- and below-ground biomass of a *Eucalyptus hybrid* in Congo. *Forest Ecology and Management*. 205:199–214.

SCHLEGEL, B.; GAYOSO, J.; GUERRA, J. 2000. Medición de la capacidad de captura de carbono en bosques de Chile y promoción en el mercado mundial: Manual de procedimientos para inventarios de carbono en ecosistemas forestales. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 15 p.

SCHROEDER, P.E.; BROWN, S.; Mo, J.; BIRDSEY, R.; CIESZEWSKI, C. 1997. Biomass estimation for temperate

broadleaf forests of the U.S. using inventory data. *For. Sci.* 11:258–264.

ZELLNER, A. 1962. An efficient method of estimating seemingly unrelated regression equations and tests for aggregation bias. *Journal of the American Statistical Association* 57: 348–368. Doi:10.2307/2281644

ZIANIS, D.; MENCUCCINI, M. 2004. On simplifying allometric analyses of forest biomass. *Forest Ecology and Management* 187:311–332.

ZIANIS, D.; MENCUCCINI, M. 2005. Aboveground net primary productivity of a beech (*Fagus moesiaca* Cz.) forest: the case study of Naousa forest, northern Greece. *Tree Phys.* 25:713–722.

ZIANIS, D.; XANTHOPOULOS, G.; KALABOKIDIS, K.; KAZAKIS, G.; GHOSN, D.; ROUSSOU, O. 2011. Allometric equations for aboveground biomass estimation by size class for *Pinus brutia* Ten. trees growing in North and South Aegean Islands, Greece. *European Journal of Forest Research* 130:145–160.

Interacción entre festuca alta infectada con endófito y *Lotus tenuis* bajo dos frecuencias de defoliación

PETIGROSSO, L.R.¹; ASSUERO, S.G.¹; VIGNOLIO, O.R.¹; ROMANO, Y.¹; COLABELLI, M.N.²; SALVAT, A.²; CRISTOS, D.³

RESUMEN

La toxicidad de festuca alta infectada con endófito asexual *Epichloë coenophiala*, puede ser atenuada cuando se la siembra en mezcla con leguminosas. El objetivo de este trabajo fue simular el establecimiento de pasturas de festuca alta (Fa) infectada puras y consociadas con *Lotus tenuis* (Lt), y evaluar el efecto de dos frecuencias de defoliación sobre la producción de biomasa aérea, la densidad de macollos de la gramínea y de tallos de la leguminosa durante el año de implantación. El experimento se llevó a cabo al aire libre en contenedores plásticos de 0,6 m x 0,4 m x 0,2 m. El 24 de febrero de 2015, se sembraron 52 semillas de Fa infectada y 12 de Lt por contenedor en el caso de la mezcla (ej. 64 plantas en total), y el mismo número de semillas de cada especie en los respectivos monocultivos (ej. 52 y 12 plantas en los monocultivos de Fa y Lt, respectivamente). El factor experimental controlado fue la frecuencia de defoliación (a 70 mm de altura): alta y baja (cada 7-9 y 14-21 días, respectivamente, variando el intervalo con la estación del año). Se empleó un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones y medidas repetidas en el tiempo (18 contenedores en total). En cada contenedor se determinó la biomasa aérea y se contó el número de macollos en Fa y el de tallos en Lt. La biomasa aérea cosechada acumulada de Fa y Lt en monocultivo y en mezcla durante el período experimental varió dependiendo de la frecuencia de defoliación y el tipo de pastura. En general, y en coincidencia con la estación de crecimiento de cada una de las especies, en los primeros cortes los monocultivos de Fa y las pasturas mezcla acumularon más biomasa aérea que los monocultivos de Lt, lo que se revirtió al final del experimento. La densidad de macollos en Fa y de tallos en Lt, tanto en monocultivos como en la mezcla, no resultó afectada por la frecuencia de defoliación, salvo al final del período experimental cuando la densidad de tallos de Lt en el monocultivo superó a la observada en la mezcla con Fa. Tanto en monocultivo como en mezcla, y contrariamente a lo observado en los cortes precedentes, la densidad de macollos en Fa y de tallos en Lt al final del período experimental tendió a ser mayor con baja frecuencia de defoliación.

Palabras clave: *Schedonorus arundinaceus*, *Epichloë coenophiala*, leguminosa, competencia.

ABSTRACT

The toxicity of tall fescue infected with asexual endophyte Epichloë coenophiala can be attenuated when the species is sown in mixture with legumes. The aim of this work was to simulate the establishment of pastures of infected tall fescue (Fa), both pure and consociated with Lotus tenuis (Lt), and to evaluate the effect of two defoliation frequencies on aerial biomass production and the number of tillers in Fa and stems in Lt during the

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Ruta Nacional 226 km 73,5, 7620 Balcarce, Argentina. Correo electrónico: petigrosso.lucas@inta.gov.ar; assuero.silvia@inta.gov.ar; vignolio.osvaldo@inta.gov.ar; yesiromano@hotmail.com; colabelli.mabel@inta.gov.ar

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Laboratorio de Toxicología, Castelar (Buenos Aires, Argentina). Correo electrónico: cristos.diego@inta.gov.ar

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), Laboratorio de Contaminantes Químicos, Castelar (Buenos Aires, Argentina). Correo electrónico: salvat.adriana@inta.gov.ar

year of implantation. The experiment was conducted outdoors in plastic containers (0.6 m x 0.4 m x 0.2 m). On 24 February 2015, 52 seeds of infected *Fa* and 12 seeds of *Lt* were sown in each container for the mixed pastures (i.e. 64 plants in total), and the same number of seeds of each species was used for the respective monocultures (i.e. 52 and 12 plants in *Fa* and *Lt* monocultures, respectively). The controlled experimental factor was the defoliation frequency (70 mm cutting height): high and low (every 7-9 and 14-21 days, respectively, the interval depending on the season). A completely randomized experimental design with 3 replicates and repeated measurements in time was used (18 containers in total). Accumulated aboveground harvested biomass of each container and the number of tillers of *Fa* and stems of *Lt* plants were determined during the experimental period. Accumulated biomass of *Fa* and *Lt* in monocultures and mixtures during the experimental period varied depending on the defoliation frequency and/or type of pasture. In general, and according to the growing season of the species, at the beginning of the experimental period *Fa* monocultures and mix pastures accumulated more biomass than *Lt* monocultures, while the opposite took place by the end of it. Tillers density in *Fa* and stems density in *Lt* for both monocultures and mix pastures were not affected by defoliation frequency, except by the end of the experimental period when the stems density in *Lt* monocultures was higher than the observed in mix pastures. Conversely to what it was observed previously, at the end of the experimental period tillers density in *Fa* and stems density in *Lt*, for both monocultures and mix pastures, tended to be higher with low than with high defoliation frequency.

Keywords: *Schedonorus arundinaceus*, *Epichloë coenophiala*, legume, competition.

INTRODUCCIÓN

La presencia de endófitos asexuales *Epichloë* spp. (Leuchtman *et al.*, 2014), ex *Neotyphodium* spp. (Glenn *et al.*, 1996), en pasturas de festuca alta, *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumont (= *Festuca arundinacea* Schreb.) (Hoveland *et al.*, 1999; Clay y Schardl, 2002) otorga beneficios a las gramíneas en su crecimiento y tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Malinowski y Belesky, 2000; White y Torres, 2009; Omacini *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a la producción de alcaloides tóxicos, principalmente ergovalina (Schardl y Phillips, 1997; Evans *et al.*, 2004), los vacunos, equinos y ovinos que consumen festuca alta infectada sufren una enfermedad clínica conocida como intoxicación con festuca alta o *festucosis* (Bacon *et al.*, 1977; De Battista *et al.*, 1995). Esta enfermedad les provoca menor ganancia diaria de peso, cambios hormonales, alteraciones reproductivas, síndrome gangrenoso e hipertérmico (Stuedemann y Hoveland, 1988).

La intoxicación debida al consumo de gramíneas infectadas con endófito tiene importante repercusión económica en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Argentina, entre otros países; y se han estimado grandes pérdidas económicas (De Battista *et al.*, 1995; Strickland *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro país no son comunes las intoxicaciones a escala de establecimientos ganaderos debido a diferentes estrategias de manejo implementadas por los productores (De Battista *et al.*, 1997). Por una parte, por ejemplo, la toxicidad puede ser atenuada si la gramínea se siembra en mezcla con otras gramíneas libres de endófito (Evans *et al.*, 2012) o leguminosas tales como *Lotus tenuis* (Waldst. et Kit. Ex Willd) y *Trifolium repens* L. (De Battista *et al.*, 1997; Manzini, 1991; Tekeli y Ateş, 2005). Por otra parte,

García Parisi *et al.* (2015) hallaron que la presencia del endófito en plantas de *Lolium multiflorum* L. no modificaría el crecimiento ni la fijación de nitrógeno de *Trifolium repens* L., y que la presencia simultánea de endófitos en gramíneas y bacterias en leguminosas resultaría positiva para la comunidad en términos de utilización de nitrógeno y productividad.

En las pasturas mezcla con leguminosas las proporciones iniciales de las especies tienden a cambiar con el tiempo, a favor de la biomasa de las gramíneas libres (León y Oesterheld 1982; Mela, 2003) o infectadas (Sutherland y Hoglund, 1989; Eerens *et al.*, 1998; Hoveland *et al.*, 1999; Vazquez de Aldana *et al.*, 2013) en detrimento de las dicotiledóneas. Este cambio en las proporciones de las mezclas puede deberse a múltiples causas, como por ejemplo: especie hospedante, especies que componen la pastura, régimen de uso de la pastura, factores climáticos, disponibilidad de nutrientes, preferencia de los herbívoros y desplazamiento competitivo (León y Oesterheld, 1982, Dirihan *et al.*, 2015). Las prácticas de manejo tendientes a mantener una cierta proporción gramínea-leguminosa bajo pastoreo deben considerar los factores antes mencionados. En tal sentido, la habilidad competitiva y la proporción de las especies en la pastura pueden ser moduladas por la frecuencia de defoliación (Manzini, 1991; Hoveland *et al.*, 1999; Stuedemann y Seman, 2005). Así, por un lado, manejos que permitan mantener una determinada proporción de la leguminosa en la mezcla reducirían la toxicidad de la pastura por "efecto de dilución" (Salminen y Grewal, 2002; Salminen *et al.*, 2003). Por otro lado, la toxicidad de festuca alta infectada aumenta con la edad de las plantas y con defoliaciones menos frecuentes e intensas (Stuedemann

y Seman, 2005). Por lo tanto, el manejo de la defoliación es una herramienta simple y de bajo costo que permitiría reducir la habilidad competitiva de la gramínea, garantizar el crecimiento y persistencia de la leguminosa y, con ello, disminuir la toxicidad de las pasturas (Salminen y Grewal, 2002; Salminen *et al.*, 2003). En este sentido, son escasos los trabajos publicados que investigan el efecto de la defoliación de pasturas mezcla de festuca infectada y leguminosas sobre dinámica de producción de sus componentes.

El objetivo de este trabajo fue simular el establecimiento de pasturas de festuca alta infectada, puras y consociadas con *L. tenuis*, y evaluar los efectos de la frecuencia de defoliación sobre la producción de biomasa aérea y la densidad de macollos/tallos de cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

Se realizó un experimento al aire libre en la Unidad Integrada Balcarce (Facultad de Ciencias Agrarias UN-MdP–Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce) 37°45'47,94"S, 58°17'38,82"W, 130 m s.n.m. Se utilizó semilla de festuca alta infectada (Fa) proveniente de una pastura del partido de Mar Chiquita (37° 32' S; 57° 55' O, identificada previamente por Petigrosso *et al.*, 2013) cosechada el 15 de diciembre de 2014 (PG 69%) y semilla escarificada de *L. tenuis* (Lt) cultivar Chajá (PG 90%) inoculada con *Rhizobium loti* (Cepa 733). Se corroboró la condición de infección endofítica de las semillas de Fa mediante análisis microscópico según el protocolo empleado por Saha *et al.* (1988) y Peretti (1994). Se emplearon 18 contenedores plásticos (unidades experimentales, UE) de 0,6 m x 0,4 m x 0,2 m, conteniendo suelo tamizado y homogeneizado, proveniente del horizonte A

de un Argiudol típico (53 ppm de P Bray⁻¹; 4,3% MO y 30,1 ppm N-NO₃⁻). El 24 de febrero de 2015 se efectuó la siembra de pasturas mezcla y monocultivos (mesocosmos) empleando una placa plástica perforada que permitió ubicar en los monocultivos de Fa y en las pasturas mezcla 13 semillas de Fa a 5 mm de profundidad en cada uno de cuatro surcos distanciados 12 cm entre sí (ej. densidad de siembra 200 plantas/m²), y en los monocultivos de Lt y en las mezclas 4 semillas de Lt en cada uno de los tres entresurcos (ej. densidad de siembra 24 plantas/m²) (figura 1). Las fallas en la emergencia de plántulas de Fa se subsanaron dentro de los 20 días desde la siembra mediante trasplantes de plántulas extracultivadas en almácigos. La fecha de emergencia promedio fue el 10 de marzo de 2015 (Siembra-emergencia: 159 °Cd). A los 30 días de emergidas las plántulas de Fa se corroboró la presencia del endófito mediante el análisis microscópico de un macollo por planta (Latch *et al.*, 1984). El 15 de abril de 2015 (173 °Cd desde la emergencia) se realizó un corte de "limpieza" para homogeneizar la altura de las UE y a partir de esa fecha se aplicaron dos niveles de frecuencia de defoliación a 70 mm de altura desde el nivel del suelo: alta y baja (cada 7-9 días y cada 14-21 días, respectivamente, variando el intervalo con la estación del año). Los contenedores se mantuvieron libres de malezas y con adecuada disponibilidad de agua durante el período experimental. El tiempo térmico acumulado (°Cd) se calculó como la sumatoria de las diferencias entre las temperaturas medias diarias y la temperatura base (4 °C; Colabelli *et al.*, 1998). Para ello se utilizaron los registros de temperatura del aire en casilla meteorológica a 1,50 m de altura de la Estación de Agrometeorología de la EEA Balcarce del INTA, ubicada aproximadamente a 300 m del sitio experimental. No se observaron ataques de plagas ni patógenos durante el desarrollo del experimento.

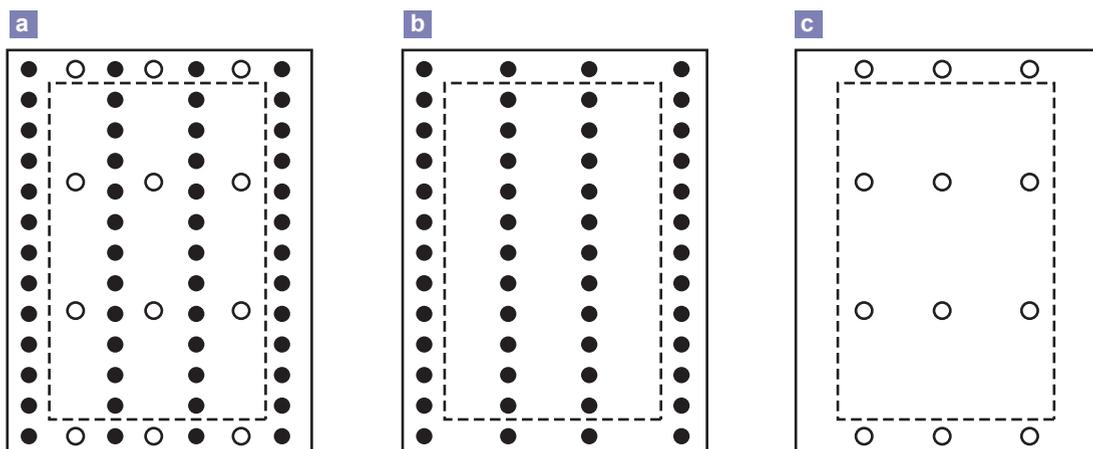


Figura 1. Arreglo espacial de las semillas en los mesocosmos (unidad experimental). a) Pastura mezcla festuca alta – lotus, b) monocultivo de festuca alta y c) monocultivo de lotus. Los círculos negros representan las semillas de festuca alta E+ y los círculos vacíos las semillas de lotus. La línea punteada encierra la zona de muestreo (en pasturas mezcla: 22 plantas de festuca alta y 6 plantas de lotus por contenedor, en monocultivo de festuca 22 plantas y en monocultivo de lotus 6 plantas).

Corte	Fecha	TT (°Cd)	Frecuencia de defoliación
1	21/04/2015	73	A
2	28/04/2015	166	A B
3	06/05/2015	242	A
4	15/05/2015	322	A B
5	09/06/2015	593	A B
6	18/08/2015	987	A
7	25/08/2015	1034	A B
8	07/09/2015	1138	A
9	14/09/2015	1185	A B
10	21/09/2015	1235	A
11	30/09/2015	1307	A B
12	20/10/2015	1439	A
13	06/11/2015	1604	A B

Tabla 1. Fechas de corte y tiempo térmico acumulado (TT, °Cd, temperatura base 4 °C) desde el corte limpieza el 15 de abril de 2015 (173 °Cd acumulados desde la emergencia el 10 de marzo de 2015) para ambas frecuencias de defoliación: alta (A, cada 7-9 días) y baja (B, cada 14-21 días).

Determinación de la biomasa aérea acumulada y del número de macollos y tallos

El primer corte experimental se realizó el 21 de abril de 2015 para los tratamientos con alta frecuencia de defoliación y el 28 de abril de 2015 para los tratamientos con baja

frecuencia. En total se realizaron 13 cortes con tijera de mano para los tratamientos con alta frecuencia y 7 cortes para los de baja frecuencia (tabla 1). Previo a cada corte se contó el número de macollos en 4 plantas de Fa (pastura mezcla y monocultivo de Fa) y el de tallos primarios y secundarios en 2 plantas de Lt (pastura mezcla y monocultivo de Lt) que habían sido previamente seleccionadas al azar y marcadas. En el laboratorio el material de cada especie se separó y se secó en estufa a 60 °C hasta peso constante.

Análisis de datos

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones y medidas repetidas en el tiempo. En total se establecieron 18 UE: 3 tipos de pastura (mezcla de Fa y Lt, y sus respectivos monocultivos), 2 frecuencias de defoliación (alta y baja) y 3 repeticiones. Debido a la diferencia en el número de cortes entre ambos tratamientos de frecuencia de defoliación (ej. 7 y 13 valores para baja y alta frecuencia de defoliación, respectivamente), el cálculo de biomasa aérea acumulada con alta frecuencia de defoliación se efectuó sumando las cantidades cosechadas en cortes sucesivos de manera de obtener el valor de biomasa acumulada correspondiente al mismo período de acumulación de los tratamientos con baja frecuencia (ej. 7 valores en total para cada frecuencia de defoliación). Los efectos de los factores experimentales y su posible interacción sobre las variables respuesta consideradas se analizaron

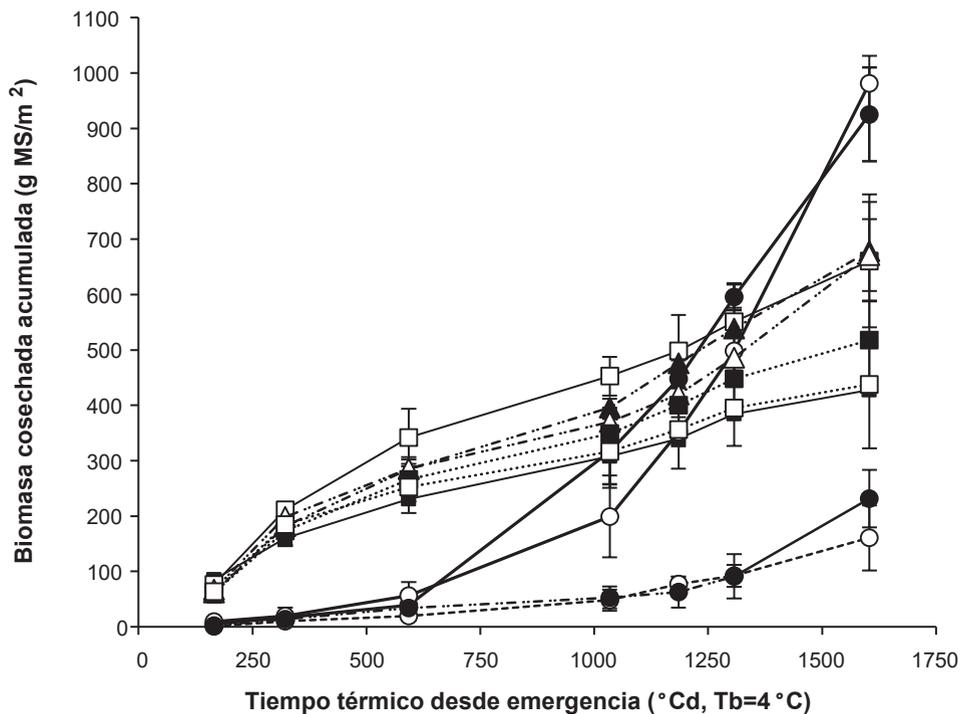


Figura 2. Acumulación de biomasa cosechada (g MS/m², media ± EE, n=3) en pasturas en mesocosmos de festuca alta infectada (Fa) en monocultivo y en mezcla con *Lotus tenuis* (Lt), Lt en monocultivo y en mezcla con Fa y mezcla de ambas especies para dos frecuencias de defoliación: alta (A, 7-9 días) y baja (B, 14-21 días). Referencias: monocultivo de Fa en A —■— y B —□—; monocultivo de Lt en A —●— y B —○—; Fa en mezcla en A —■— y B —□—; Lt en mezcla en A —●— y B —○— y mezcla en A —▲— y B —△—.

mediante análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo. Se realizaron comparaciones de medias (LSD $p < 0,05$) cuando se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$). Debido a que de las variables respuesta no cumplieron con los supuestos de normalidad ni homogeneidad de varianzas debieron transformarse (ej. \ln de la densidad de macollos y de tallos; y \ln de la biomasa aérea acumulada+1). Todos los análisis se realizaron empleando el software estadístico R (R Development Core Team, 2015). Los modelos se ajustaron con la función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa aérea cosechada acumulada

En la figura 2 se observa la acumulación de la biomasa cosechada en los monocultivos y en la mezcla para ambas frecuencias de defoliación. Se detectó interacción significativa entre el tipo de pastura, frecuencia de defoliación y fecha de corte ($p < 0,0001$). Se puede observar que hasta 593 °Cd no hubo diferencias significativas en la producción de biomasa acumulada debido a la frecuencia de defoliación, pero sí al tipo de pastura. En este sentido, se observó que las producciones de biomasa de los monocultivos de Fa y de las mezclas fueron similares y superiores a las de los monocultivos de Lt. Entre los 1034 °Cd y los 1307 °Cd se registró una interacción significativa entre el tipo de pastura y la frecuencia de defoliación. Ello se debió a que la biomasa acumulada fue mayor en los monocultivos de Fa con baja frecuencia, lo contrario ocurrió en los monocultivos de Lt, y no hubo diferencias entre frecuencias de defoliación en las mezclas. Por una parte, la producción de biomasa total acumulada al final del experimento (1604 °Cd) fue mayor en los monocultivos de Lt independientemente

de la frecuencia de defoliación. Las biomazas acumuladas en los monocultivos de Fa y de las pasturas mezcla no presentaron diferencias significativas entre sí, aunque la biomasa del monocultivo de Fa con alta frecuencia de defoliación tendió a ser menor que las restantes ($p = 0,0901$). Por otro lado, se observó que en las pasturas mezclas la contribución relativa de Lt a la biomasa acumulada total fue mayor con baja que con alta frecuencia de defoliación (35% y 24%, respectivamente).

Al comparar la producción de biomasa de Fa en monocultivo y en mezcla con Lt se observó que ninguno de los efectos principales ni sus interacciones fueron significativos ($p > 0,05$). La falta de respuesta a la frecuencia de defoliación hallada en el presente experimento en el monocultivo de Fa durante el invierno, se contrapone con los resultados de Hart *et al.* (1971) quienes encontraron una mayor producción de biomasa de Fa cuando la frecuencia de defoliación era baja. Sin embargo, por un lado, las frecuencias de defoliación estudiadas por estos autores fueron más contrastantes que las estudiadas en este trabajo, la frecuencia alta fue similar (7 días), mientras que en la baja las pasturas se defolaban una vez por mes. Por otro lado, la mayor producción del monocultivo de Fa a baja frecuencia de defoliación contradice lo reportado por Kerrisk y Thomson (1990) quienes hallaron una mayor producción de biomasa de Fa cuando la pastura fue defoliada con alta frecuencia. Sin embargo, la frecuencia alta fue similar a la baja de este experimento (15 días) y la baja frecuencia correspondió a intervalos de 30 días. En el presente trabajo se aplicaron dos frecuencias de defoliación relativamente altas ya que se ha sugerido que una alta frecuencia de defoliación podría reducir las concentraciones de ergocalcoides en plantas de Fa infectada y, por ende, su toxicidad dado que las plantas destinarían una alta proporción de

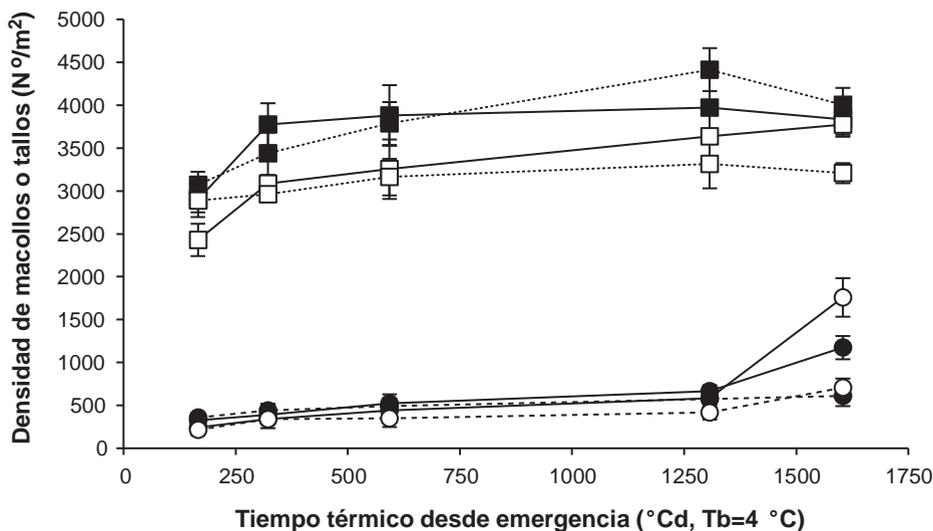


Figura 3. Dinámica de la densidad de macollos o tallos en pasturas en mesocosmos de festuca alta infectada (Fa) y *Lotus tenuis* (Lt) en monocultivo y en mezcla bajo dos frecuencias de defoliación: alta (A, 7-9 días) y baja (B, 14-21 días). Referencias: monocultivo de Fa en A —■— y B —□—; monocultivo de Lt en A —●— y B —○—; Fa en mezcla en A —■— y B —□—, Lt en mezcla en A —●— y B —○—.

carbohidratos para el rebrote, dejando menos fotoasimilados disponibles para la síntesis de alcaloides por parte del endófito (Belesky y Hill, 1997).

La biomasa acumulada de Lt no fue afectada en los tres primeros cortes ni en el monocultivo ni en la mezcla por la frecuencia de defoliación ni por el tipo de pastura ($p > 0,05$). Entre los 1034 °Cd y 1307 °Cd se registró interacción entre el tipo de pastura y la frecuencia de defoliación ($p < 0,05$) dado que Lt en monocultivo produjo más biomasa con alta frecuencia de defoliación que con baja frecuencia, mientras que en las mezclas no se registraron diferencias entre frecuencias. En el último corte (1604 °Cd), la acumulación de biomasa de Lt fue mayor en los monocultivos que en las mezclas ($p < 0,0001$) y no hubo efecto significativo de la frecuencia de la defoliación ($p = 0,1096$).

La escasa producción de biomasa aérea de Lt en los primeros cortes estuvo relacionada con las bajas tasas de crecimiento características de la especie en ese momento del año (Sevilla *et al.*, 1996; Vignolio y Fernández, 2011). Sin embargo, en la época primavera-estival, cuando esta especie presenta las mayores tasas de crecimiento (Colabelli y Miñón, 1993; Vignolio *et al.*, 2010), la producción de biomasa acumulada de Lt aumentó hasta superar en el último corte a las demás pasturas, independientemente de la frecuencia de defoliación. Acuña y Cuevas (1999) tampoco hallaron una respuesta significativa de la frecuencia de defoliación (6 y 8 semanas entre defoliaciones) en un monocultivo de Lt bajo riego sobre la producción de materia seca. La menor producción de biomasa de Lt en mezcla podría deberse a la mayor habilidad competitiva de la gramínea con respecto a la leguminosa (Muslera y Ratera, 1991; Hernández *et al.*, 2005).

Densidad de macollos de festuca alta infectada y tallos de *Lotus tenuis*

En la figura 3 se observa la dinámica de la densidad de macollos de Fa y de tallos de Lt en monocultivo y en mezcla para ambas frecuencias de defoliación. En el caso de Fa, ninguno de los efectos principales ni sus interacciones fue significativo ($p > 0,05$). Sin embargo, se observó que la densidad de macollos de Fa tendió a ser mayor en alta frecuencia de defoliación tanto en monocultivo como en mezcla ($p = 0,0720$). Estos resultados coinciden con los publicados por Parsons *et al.* (1983) y Lemaire y Chapman (1996) quienes hallaron que las pasturas manejadas con alta frecuencia de defoliación desarrollarían una estructura con una mayor densidad de macollos de menor tamaño que aquellas sometidas a bajas frecuencias de defoliación, lo que se explicaría por la ley de los $-3/2$ o de la compensación tamaño/densidad (Matthew *et al.*, 1995).

Por un lado, la densidad de tallos de Lt solamente fue afectada por el tipo de pastura ($p = 0,042$) y la fecha de corte ($p < 0,0001$). Hasta los 1307 °Cd no hubo diferencias en la densidad de tallos de Lt debido al tipo de pastura ni a la frecuencia de defoliación, aunque hasta ese momento tendió

a ser mayor con alta frecuencia de defoliación ($p = 0,0802$). Al final del experimento (1604 °Cd), y en coincidencia con lo observado en la producción de biomasa aérea, la densidad de tallos de Lt fue mayor en el monocultivo que en la mezcla. La falta de respuesta del Lt a la frecuencia de defoliación también fue reportada por Acuña y Cuevas (1999) para monocultivos de Lt bajo riego sometidos a frecuencias de defoliación más bajas (6 y 8 semanas) que las de este experimento. Por otro lado, y contrariamente a lo encontrado en los cortes precedentes, a 1604 °Cd la densidad de tallos de Lt en monocultivo tendió a ser mayor a baja frecuencia de defoliación ($p = 0,096$), probablemente porque en la frecuencia de defoliación alta el intervalo de corte fue demasiado breve, restringiendo la recuperación del área foliar y limitando la producción de fotosintatos necesarios para el rebrote de las yemas de la corona (Colabelli y Miñón, 1994; Acuña y Cuevas, 1999).

CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. La frecuencia de defoliación y el tipo de pastura afectaron a la biomasa aérea cosechada acumulada de Fa y Lt en monocultivo y en mezcla en forma diferencial durante el período experimental. Por un lado, la biomasa total acumulada en los monocultivos de Fa y de las pasturas mezcla no presentaron diferencias significativas entre sí, aunque la biomasa del monocultivo de Fa con alta frecuencia de defoliación tendió a ser menor que las restantes. Por otro lado, la biomasa aérea cosechada acumulada de Lt en monocultivo fue baja al principio del período experimental, pero superó a la de las pasturas mezcla y monocultivos de Fa al final del mismo debido a las mayores tasas de crecimiento de la leguminosa en la primavera.
2. La densidad de macollos de Fa y de tallos de Lt, tanto en monocultivos como en la mezcla, no resultó afectada por la frecuencia de defoliación aunque tendió a ser mayor con alta frecuencia. Solamente al final del experimento, el número de tallos en el monocultivo de Lt superó a la observada en la mezcla con Fa, lo que podría deberse a la mayor habilidad competitiva de la gramínea que afectaría negativamente el crecimiento de Lt y, a su vez, tanto en monocultivo como en mezcla y contrariamente a lo observado en cortes precedentes tendió a ser mayor con baja que con alta frecuencia de defoliación.

Los resultados de este experimento indican que las pasturas, mezcla de festuca alta y *Lotus tenuis*, defoliadas con una frecuencia de aproximadamente 15 días tenderían a presentar una mayor proporción de biomasa de lotus que las defoliadas más frecuentemente. Estos resultados deberían corroborarse en futuros experimentos en los que se analice, además de la dinámica de producción de biomasa de ambos componentes de la mezcla, el contenido de ergocaloides del forraje cosechado para verificar si disminuye la toxicidad por un efecto de dilución.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se desarrolló en el marco del Proyecto 15/A473, AGR 472/15 de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Los autores agradecen a la empresa KWS por el suministro de la semilla de *Lotus tenuis* empleada.

BIBLIOGRAFÍA

- ACUÑA, P.H.; CUEVAS, G.C. 1999. Efecto de la altura y frecuencia de la defoliación, bajo corte y pastoreo, en el crecimiento y productividad de tres especies del género *Lotus* en suelos arcillosos. *Agricultura Técnica*. 59: 296–308.
- BACON, C.W.; PORTER, J.K.; ROBBINS, J.D.; LUTTRELL, E.S. 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *App. Environ. Microbiol.* 34:576–581.
- BELESKY, D.P.; HILL, S. 1997. Defoliation and Leaf Age Influence on Ergot Alkaloids in Tall Fescue. *Ann. Bot.* 79: 259–264
- CLAY, K.; SCHARDL, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am. Nat.* 160: 99–127.
- COLABELLI, M.; AGNUSDEI, M.; MAZZANTI, A.; LABREVEUX, M., 1998. El proceso de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras como base para el manejo de la defoliación. INTA EEA Balcarce. Buenos Aires, Argentina. Boletín Técnico N.º 148. 1–14 pp.
- COLABELLI, M.R.; MIÑÓN, D.P. 1993. Métodos de intersembrado de *Lotus tenuis* y *Trifolium repens* en pastizales de la Pampa Deprimida bonaerense. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 13: 225–233.
- COLABELLI, M.; MIÑÓN, D. 1994. Rendimiento y cambios botánicos de pasturas de *Lotus tenuis* puro y en mezcla bajo régimen de corte. *Agricultura Técnica*. 54: 39–45.
- DE BATTISTA, J.; PERETTI, A.; CARLETTI, S.; RAMIREZ, A.; COSTA, M.; SCHULTZ, L. 1995. Evolución de la incidencia de la infección de *Acremonium coenophialum* en la oferta de semilla de festuca alta en Argentina. Período 1987-1994. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15: 300–302.
- DIRIHAN, S.; HELANDER, M.L.; SALONIEMI, I.; GUNDEL, P.E.; SAIKKONEN, K. 2015. Effects of systemic fungal endophytes on the performance of meadow fescue and tall fescue in mixtures with red clover. *Grass Forage Sci.* 70: 465–473.
- DONAGHY, D.J.; TURNER, L.R.; ADAMCZEWSKI, K.A. 2008. Effect of defoliation management on water-soluble carbohydrate energy reserves, dry matter yields, and herbage quality of tall fescue. *Agr. J.* 100: 122–127.
- EERENS, J.P.; LUCAS, R.J.; EASTON, H.S.; WHITE, J.G. 1998. Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool-moist environment III. Interaction with clover. *NZ. J. Agr. Res.* 41: 201–207.
- EVANS, T.J.; ROTTINGHAUS, G.E.; CASTEEL, S.W. 2004. Ergot. In: Plumlee, K.H. (ed.), *Clinical Veterinary Toxicology*, Mosby, St. Louis, MO. 239–243 pp.
- EVANS, T.J.; BLODGETT, D.J.; ROTTINGHAUS, G.E. 2012. Fescue toxicosis. *Vet Toxicol.* 87: 1166–1177.
- GARCÍA PARISI, P.A.; LATTANZI, F.A.; GRIMOLDI, A.A.; OMACINI, M.I. 2015. Multi-symbiotic systems: functional implications of the coexistence of grass–endophyte and legume–rhizobia symbioses. *Oikos*. 124: 553–560.
- GLENN, A.E.; BACON, C.W.; PRICE, R.; HANDIL, R.T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycol.* 88: 369–383.
- HART, R.H.; CARLSON, G.E.; MCCLOUD, D.E. 1971. Accumulative effects of cutting management on forage yields and tiller densities of tall fescue and orchard grass. *Agr. J.* 63: 895–898.
- HERNÁNDEZ, S.R.; PÉREZ, J.O.; GUILLÉN, R.J.; CASTRO, E.H. 2005. Manejo de praderas asociadas de gramíneas y leguminosas para pastoreo en el trópico. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. (Disponible: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> verificado: 10 de marzo de 2015).
- HOVELAND, C.S.; BOUTON, J.H.; DURHAM, R.G. 1999. Fungal endophyte effects on production of legumes in association with tall fescue. *Agr. J.* 91: 897–903.
- KEMP, S. 2004. Fescue to the rescue. *Aust Dairy Farmer*. 19:78.
- KERRISK, J.J.; THOMSON, N.A. 1990. Effect of intensity and frequency of defoliation on growth of ryegrass, tall fescue and phalaris. *Proc. New Zeal. Grass. Assoc.* 51:135–138.
- LATCH, G.C.M.; CHRISTENSEN, M.J.; SAMUELS, G.J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon* 20: 535–550.
- LEMAIRE, G.; CHAPMAN, D. 1996. Tissue flows in grazed plant communities. En: HODGSON, J.; ILLIUS, A.W. (Eds.). *The ecology and management of grazing system*. CAB International. 3–36 pp.
- LEÓN, R.J.C.; OESTERHELD, M. 1982. Envejecimiento de pasturas implantadas en el norte de la Depresión del Salado. Un enfoque sucesional. *Rev. Fac. Agron.* 3: 41–49.
- LEUCHTMANN, A.; BACON, C.W.; SCHARDL, C.L.; WHITE, J.F.; TADYCH, M. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycol.* 106: 202–215.
- MALINOWSKI, D.; BELESKY, D. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.* 40: 923–940.
- MANZINI, N.A. 1991. Estudios sobre *Acremonium* sp. en festuca. INIA. Unidad de Difusión e Información Tecnológica. Montevideo-Uruguay. Serie Técnica N.º 8. 16 p.
- MATTHEW, C.; LEMAIRES, G.; SACKVILLE HAMILTON, R.N. 1995. A modified self-thinning equation to describe size density relationships for defoliation swards. *Ann. Bot.* 76: 579–587.
- MELA, T. 2003. Red clover in a mixture with grasses: yield, persistence and dynamics of quality characteristics. *Agr. Food Sci. Finland.* 12: 195–212.
- MUSLERA PARDO, E.; RATERA GARCÍA, C. 1991. Las gramíneas. En: MUSLERA PARDO, E.; RATERA GARCÍA, C. (Eds.). *Praderas y forrajes: producción y aprovechamiento*. Mundi-Prensa, Madrid. 29–114 pp.
- OMACINI, M.; GUNDEL, P.; SEMMARTIN M. G. 2013. Huellas de la simbiosis pasto-endófito en el agroecosistema. En: GARCÍA DE SALAMONE, I.E.; VÁZQUEZ, S.; PENNA, C.; CASSAN, F. (Eds.). *Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable*. División de Microbiología Agrícola y Ambiental, Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 73 p.
- PARSONS, A.J.; LEAFE, E.L.; COLLET, B.; STILES, W. 1983. The physiology of grass production under grazing. I. Characteristics of leaf and canopy photosynthesis of continuously-grazed swards. *J. Appl. Ecol.* 20: 117–126.
- PERETTI, A. 1994. Manual para análisis de semillas. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 281 p.
- PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. 2012. R Development Core Team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1–103.
- PETIGROSSO, L.R.; COLABELLI, M.N.; FERNÁNDEZ, O.N.; ISPIZÚA, V.; CENDOYA, M.G. 2013. Incidence of the endophyte

- fungus *Neotyphodium coenophialum* in pastures of tall fescue differing in age and soil characteristics. *Afr. J. Agric. Res.* 8 (22): 2655–2662.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (Disponible: <http://www.R-project.org/> verificado: 15de junio de 2015).
- SAHA, C.D.; JACKSON, M.A.; JOHNSON-CICALESE, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. *Phytopathol.* 78: 237–239
- SALMINEN, S.O.; GREWAL, P.S. 2002. Does decreased mowing frequency enhance alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *J. Chem. Ecol.* 28: 939–950.
- SALMINEN, S.O.; GREWAL, P.S.; QUIGLEY, M.F. 2003. Does mowing height influence alkaloid production in endophytic tall fescue and perennial ryegrass? *J. Chem. Ecol.* 29: 6–10.
- SCHARDL, C.L.; PHILLIPS, T.D. 1997. Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Dis.* 81: 430–438.
- SEVILLA, G.H.; FERNÁNDEZ, O.N.; MIÑON, D.P.; MONTES, L. 1996. Emergence and seedling survival of *Lotus tenuis* in *Festuca arundinacea* pastures. *J. Range Manage.* 49: 509–511.
- STRICKLAND, J.R.; LOOPER, M.L.; MATTHEWS, J.C.; ROSENKRANS, C.F.; FLYTHE, M.D. JR.; BROWN, K.R. 2011. St. Anthony's fire in livestock: Causes, mechanisms, and potential solutions. *J. Anim. Sci.* 89: 1603–1626.
- STUEDEMANN, J.A.; HOVELAND, C.S. 1988. Fescue endophyte: History and impact on animal agriculture. *J. Prod. Agr.* 1:39–44.
- STUEDEMANN, J.A.; SEMAN, D.H. 2005. Integrating genetics, environment, and management to minimize animal toxicoses. En: ROBERTS, C.A.; WEST, C.P.; SPIERS, D.E. (Eds). *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses. Blackwell, Oxford, Reino Unido. 305–324 pp.
- SUTHERLAND, B.L.; HOGLUND, J.H. 1989. Effect of ryegrass containing the endophyte (*Acremonium lolii*) on the performance of associated white clover and subsequent crops. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 50: 265–269.
- TEKELI, A.S.; ATES, E. 2005. Yield potential and mineral composition of white clover (*Trifolium repens* L.) – tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) mixtures. *J. Cent. Eur. Agr.* 6: 27–34.
- VIGNOLIO, O.R.; CAMBARERI, G.S.; MACEIRA, N.O. 2010. *Lotus tenuis* (Fabaceae). Productividad y manejo agronómico. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 30: 97–116.
- VIGNOLIO, O.R.; FERNÁNDEZ, O.N. 2011. *Lotus tenuis* seedling establishment and biomass production in Flooding Pampa grasslands (Buenos Aires, Argentina). *Chil. J. Agr. Res.* 71: 96–103.
- VAZQUEZ DE ALDANA, B.R.; ZABALGOGEAZCOA, I.; GARCIA-CIUDAD, A.; GARCIA-CRIADO, B. 2013. An *Epichloe* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. *Plant Soil.* 362: 201–213.
- WHITE, J.F.JR.; TORRES, M. 2009. Defensive mutualism in microbial symbiosis. CRC Press. Boca Raton, FL. 333–334 pp.

Caracterización de genotipos de *Gossypium hirsutum* L. sobre su tolerancia a estrés hídrico

SPOLJARIC, M.V.¹; TCACH, M.A.¹; ROJAS, J.M.¹; TARRAGO, J.R.²; COINTRY, E.L.³

RESUMEN

El déficit hídrico y la alta demanda atmosférica en climas subhúmedos limita la productividad de los cultivos, la selección de variedades tolerantes es una estrategia para minimizar el impacto. El objetivo fue caracterizar 20 genotipos de *Gossypium hirsutum* L. pertenecientes al banco de germoplasma de INTA EEA Sáenz Peña por su tolerancia al estrés hídrico mediante variables fisiológicas.

El ensayo se realizó bajo condiciones controladas en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Las Breñas durante el año 2014. Se utilizó un diseño experimental bifactorial; el factor A fue la presencia o ausencia de estrés (se suspendió la oferta de agua a partir de la tercera hoja verdadera y 50% de CC por seis días) y el factor B fueron 20 genotipos de algodón. Se midieron conductancia estomática (C_e , $\text{mmol/m}^2/\text{s}^{-1}$), temperatura foliar (T , °C) y contenido de agua relativo (CAR, %). Por un lado, los resultados del análisis univariado mostraron interacción significativa entre el efecto del tratamiento y los genotipos, tanto para C_e como para CAR. En T solo se observó diferencia entre los genotipos. Por otro lado, las diferencias genéticas en las variables fisiológicas fueron bajas debido a un fuerte efecto ambiental causado por las condiciones de estrés, que enmascararon la variancia genética. Las variables analizadas en conjunto en el análisis de componentes principales pudieron separar a los tratamientos significativamente y clasificar a los genotipos en tres grupos contrastantes. Los genotipos con mejor comportamiento frente al estrés hídrico en relación con el CAR y la C_e conjuntamente fueron BGSP 756, BGSP 463, BGSP 804, BGSP 735, BGSP 803, BGSP 514, BGSP 67, BGSP 475, BGSP 507 y SP 48114.

Palabras clave: caracterización, *Gossypium hirsutum* L., tolerancia a estrés hídrico.

ABSTRACT

*Water deficit and high atmospheric demand in subhumid climates limit the productivity of crops, being the selection of tolerant varieties a strategy to minimize their impact. The objective was to characterize 20 genotypes of *Gossypium hirsutum* L. belonging to the germplasm bank of INTA EEA Sáenz Peña for their tolerance to water stress by means of physiological variables. The trial was carried out under controlled conditions in the EEA INTA Las Breñas during the year 2014. A bifactorial experimental design was used, being the factor A the presence or absence of stress (water supply was suspended from the third true leaf and 50% FC for six days), and factor B 20 cotton genotypes. Stomatal conductance (C_e , $\text{mmol} / \text{m}^2 / \text{s}^{-1}$), leaf temperature (T , °C)*

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Sáenz Peña, Ruta Nacional N° 95 km 1108, 3700, Pcia. R. Sáenz Peña, Chaco, Argentina. Correo electrónico: spoljaric.monica@inta.gob.ar

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Las Breñas, Ruta Nacional N° 89 km 227, 3722 Las Breñas, Chaco, Argentina. Correo electrónico: tarrago.jose@inta.gob.ar

³Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias, Campo Experimental Villarino, CC N° 14 (S2125ZAA), Zavalla, Santa Fe, Argentina. Correo electrónico: ecointry@unr.edu.ar

and relative water content (RWC, %) were measured. The results of the univariate analysis showed a significant interaction between the factors treatment and genotype for Sc and RWC. For T, only difference between genotypes was observed. On the other hand, the genetic differences in the physiological variables were low due to a strong environmental effect caused by the stress conditions, which masked the genetic variance. The variables analyzed together by a main component analysis were able to separate the treatments significantly and classified the genotypes into three contrasting groups. The genotypes with the best behavior against water stress in relation to RWC and Sc together were BGSP 756, BGSP 463, BGSP 804, BGSP 735, BGSP 803, BGSP 514, BGSP 67, BGSP 475, BGSP 507 y SP 48114.

Keywords: characterization, *Gossypium hirsutum* L., tolerance to water stress.

INTRODUCCIÓN

El algodón (*Gossypium spp.*) es el principal cultivo de fibra natural en el mundo y, en la Argentina es de gran importancia en el norte del país, especialmente en la provincia de Chaco que concentra aproximadamente el 50% del área de siembra (Delssin, 2015), y donde se registra cerca del 70% de la producción nacional. Las provincias con mayor superficie sembrada son: Chaco (269.350 ha), Santiago del Estero (135.000 ha), Santa Fe (96.000 ha), y Formosa (16.000 ha); y en menor porcentaje Salta (9.000 ha), San Luis (2.700 ha), Entre Ríos (1.100 ha), Corrientes (480 ha) y Córdoba (350 ha). En la mayor parte de la región del noreste (NEA) y noroeste (NOA) el algodón se siembra bajo seco, lo cual provoca inestabilidad en los rendimientos entre campañas agrícolas debido a su dependencia de la oferta hídrica.

El crecimiento y desarrollo del algodón no solo se ve influenciado por el promedio anual de precipitaciones, sino también por la regularidad y su distribución estacional (Arturi, 1984). El Chaco presenta zonas con clima subtropical con y sin estación seca. Las precipitaciones oscilan de este a oeste, entre 1300 y 500 mm anuales, dependiendo del año climático. El área principal de producción de seco se encuentra en la zona con estación seca, en el centro y sudoeste provincial (Rofman, 1999). En seco con precipitaciones inferiores a los 750 mm disminuye notoriamente la posibilidad de éxito. Otro factor climático importante es la evapotranspiración potencial que en la región puede alcanzar hasta 1600 mm anuales, indicando en meses de alta temperatura y velocidades de viento, déficit o balance hídrico negativo entre precipitación y evapotranspiración.

La disponibilidad y calidad del agua afectan al crecimiento y los procesos fisiológicos de todas las plantas, ya que el agua es el componente principal de las plantas en crecimiento activo, representando un 70-90% de materia fresca de esta (Gardner y Gardner, 1983), y es el principal factor limitante del crecimiento. El algodón se considera bajo estrés hídrico cuando el agua útil del suelo, o utilizable por las plantas, alcanza niveles inferiores al 50% (Paytas *et al.*, 2014). Sin embargo, algunos autores (Brubaker y Wendel,

1994; Brubaker *et al.*, 1999) sugieren que el algodón está adaptado a episodios de sequía periódica, ya que el 90% del algodón cultivado en el mundo fue domesticado en regiones semiáridas del sur de México y norte de Guatemala. Sin embargo, Roark y Quisenberry (1977) reportaron que la variabilidad genética en los rasgos de tolerancia a estrés hídrico en los cultivares modernos es potencialmente baja, debido a que la mayoría fueron seleccionados bajo condiciones limitantes. No obstante, las razas primitivas de algodón han sido identificadas como fuentes potenciales de características asociadas a la tolerancia a estrés hídrico (Quisenberry *et al.*, 1982; Basal *et al.*, 2003).

Las plantas pueden soportar condiciones de sequía evitando la deshidratación de sus tejidos manteniendo al mismo tiempo el potencial de agua tisular tan alto como le sea posible (Ehleringer y Cooper 1992). Paralelamente existen otras especies que toleran bajos contenidos hídricos en los tejidos por mantenimiento del potencial de turgencia, ajuste osmótico y alta elasticidad de la pared celular (Evans, 1983; Kramer, 1983; Salisbury y Ross, 1985; Loomis y Connor, 1992). La regulación de estomas, o ajuste estomático, es un mecanismo para ajustar la pérdida de agua, utilizado como indicador de estrés hídrico (Fambrini *et al.*, 1995; Franca *et al.*, 2000). Asimismo, el contenido de agua relativo es un indicador de tolerancia a la desecación en cultivos como trigo y soja (Schonfeld *et al.*, 1988; Carter, 1989).

En este contexto, el objetivo fue caracterizar 20 genotipos de algodón pertenecientes al banco de germoplasma de INTA EEA Sáenz Peña por su tolerancia al estrés hídrico mediante variables fisiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 20 genotipos pertenecientes a entradas de la colección de algodón del Banco de Germoplasma de INTA EEA Sáenz Peña, seleccionados por sitio de origen y tipo de población (tabla 1). La selección se realizó de acuerdo a lo reportado por Gómez (2007) cuando estimó la diversidad genética en entradas de *G. hirsutum* L. del banco a través de marcadores moleculares, concluyendo

que la mayor distancia genética o variabilidad comprendían genotipos de diferentes orígenes y población.

Para el tratamiento de estrés hídrico en etapa de crecimiento vegetativo se utilizó el protocolo de Parkhi *et al.* (2009), el cual se ajustó según los requerimientos del experimento. El ensayo se realizó en la EEA INTA Las Breñas, Chaco, durante los meses de mayo y junio de 2014, en cámaras climatizadas bajo condiciones controladas de luz (300 $\mu\text{m}/\text{seg} \cdot \text{m}^2$), temperatura (16 h de oscuridad a 20 °C y 8 h de luz a 30 °C) y 80% de humedad relativa. Este se considera un ensayo de corto plazo, por abarcar la etapa vegetativa solamente.

Se diseñó un experimento bifactorial donde el factor A correspondió al tratamiento principal: sin estrés (control: sin limitaciones de agua) y con estrés (con suspensión de la oferta de agua a partir de tres hojas y 50% de capacidad de campo). El factor B fueron los 20 genotipos caracterizados de diversos orígenes y población.

Genotipo	Población	Origen
BGSP 43	Cultivar obsoleto	EUA
BGSP 52	Cultivar obsoleto	Brasil
BGSP 67	Cultivar obsoleto	Costa de Marfil
BGSP 73	Cultivar obsoleto	Costa de Marfil
BGSP 156	Línea	EUA
BGSP 392	Cultivar obsoleto	Argentina
BGSP 463	Cultivar obsoleto	EUA
BGSP 475	Cultivar obsoleto	Argentina
BGSP 507	Cultivar obsoleto	Argentina
BGSP 514	Cultivar obsoleto	Australia
BGSP 715	Cultivar obsoleto	Pakistán
BGSP 716	Cultivar obsoleto	Siria
BGSP 735	Cultivar obsoleto	URSS
BGSP 750	Cultivar moderno	China
BGSP 765	Local	China
BGSP 799	Cultivar moderno	Argentina
BGSP 803	Línea	Argentina
BGSP 804	Línea	Argentina
BGSP 805	Línea	Argentina
SP48114	Línea	Argentina

Tabla 1. Genotipos de algodón pertenecientes al banco de germoplasma de EEA Sáenz Peña.

*Cultivar obsoleto o en desuso y moderno: hace referencia a la sustitución en el uso por el productor. Línea: se refiere al material desarrollado por los mejoradores que son conservados en los bancos de germoplasma por su valor real o potencial. Local: son variedades primitivas, tradicionales o criollas y que son producto de una selección por parte de los agricultores con gran adaptación a condiciones abióticas y bióticas.

Se utilizaron 40 macetas de 2 L de capacidad, distribuidas al azar dentro de las cámaras. Las macetas fueron cargadas con suelo seco de textura franca y se llevó a todas al mismo peso de 1.3 kg de suelo seco. Se calcularon los mm necesarios para llevar el suelo a capacidad de campo (CC) y se regaron todas las macetas con ese volumen, llevándose a un peso de 1.55 kg. Se sembraron diez semillas por maceta, las cuales fueron regadas cada tres días hasta la germinación mantenidas entre 90 y 100% de CC. Se realizó un raleo en las macetas dejando cinco plantas uniformes en altura, tamaño y número de hojas verdaderas. Luego se regó periódicamente hasta la aparición de tres hojas verdaderas despegadas, momento en el cual se suspendió el riego para lograr condiciones de estrés en 20 macetas. En el tratamiento control se mantuvo el contenido de humedad óptimo. Previo al inicio del estrés, se equipararon los pesos de las macetas mediante riego. Cada dos días se pesaron las macetas y se equipararon los pesos a la de mayor valor para que de esta manera lleguen todas a un mismo contenido de humedad en la misma cantidad de días. Se consideró el inicio del estrés cuando las macetas presentaron el peso correspondiente al 50% de CC. A los seis días de suspendido el riego con manifestación de marchitamiento en todas las plantas, se midió la conductancia estomática (C_e , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para evaluar el grado de apertura estomática, y la temperatura foliar (T_f , °C) por medio de un porómetro foliar (SC-1 Decagon) con rango de mediciones desde 0 hasta 1.000 $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se registraron ambas variables en el mismo momento para evitar que el aumento de temperatura de la hoja disminuyera la conductancia estomática (Möller *et al.*, 2007). Para determinar el contenido de agua relativo (CAR, %) se extrajeron las hojas inmediatamente después de medir las variables mencionadas y se estimó CAR con la fórmula descrita por Schonfeld *et al.* (1988):

$$\text{CAR (\%)} = \frac{(\text{PF} - \text{PS})}{(\text{PT} - \text{PS})} \times 100$$

PF= Peso fresco de la tercera hoja verdadera diferenciada.

PT= Peso de máxima turgencia. Luego de determinar PF se dejaron las hojas en agua destilada en placas de Petri selladas con parafilm por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurridas 24 h se pasaron a papel de filtro para eliminar el excedente de agua para luego ser pesadas.

PS = Peso seco. Se colocaron las muestras en estufa a 70 °C por 72 h y se pesaron.

El ensayo se realizó dos veces en momentos de tiempo (mayo y junio) diferentes, elegidos aleatoriamente, que se consideraron repeticiones. La duración del ensayo fue de 30 días.

El análisis estadístico se dividió en dos aproximaciones: univariado y multivariado. Para el primero se realizó un análisis inferencial por medio de modelos generales lineales y mixtos con el programa estadístico InfoStat/P (Di Rienzo *et al.*, 2014) a través de su interfaz con el programa R. Se consideraron tratamiento y genotipos como efectos

fijos y a las repeticiones como efecto aleatorio. Se evaluó además la interacción entre los efectos fijos. Se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para cada modelo y se corrigió, cuando fue necesario, la heterogeneidad de las varianzas, seleccionando el modelo más parsimonioso en cada caso por medio de los coeficientes AIC y BIC. Para la comparación de los valores promedios se utilizó la prueba LSD de Fisher con un valor de significancia del 5% ($p < 0,05$).

Además se calcularon los componentes de la varianza para determinar la Heredabilidad en sentido amplio (H^2) o Grado de Determinación Genética (GDG) en las variables que presentaron diferencias significativas para tratamiento principal siguiendo el modelo propuesto por Mariotti (1986) y utilizando la fórmula de Falconer (1981).

$$H^2 = \frac{Vg}{Vf}$$

Vg: varianza genética

Vf: varianza fenotípica

Para el análisis multivariado se utilizó el programa R versión 3.0.1 (R, 2011). Se estandarizaron los datos y se construyó una matriz de correlaciones lineales, luego se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) por medio del paquete FactoMineR, que posibilita realizar elipses de confianza para las medias de grupo según el tratamiento principal y conocer los p-valores ($p < 0,05$) de la correlación entre grupos. Una vez verificado si las variables podían separar significativamente a los tratamientos, se procedió a realizar nuevamente ACP solo con los datos del tratamiento con déficit hídrico. Con estos resultados se confeccionaron biplots sobre las dos primeras componentes principales (CP) y luego se realizó un análisis de conglomerados para profundizar en los agrupamientos.

RESULTADOS

Análisis univariado

Conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

La Ce presentó diferencias significativas entre tratamientos, genotipos y su interacción (tabla 2). La Ce fue afectada por el estrés hídrico ($3,82 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) al compararla con el promedio del control ($125,37 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). La interacción significativa expresó que la Ce en condiciones de estrés hídrico fue similar entre genotipos, presentando valores mínimos y máximos de $2,32$ a $11,55 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, en condiciones de buena disponibilidad hídrica (sin estrés) los genotipos mostraron mayor variación, con un valor mínimo y máximo de $12,28$ y $269,25 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente. El genotipo BGSP 799 presentó el mayor valor de Ce ($269,25 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en condiciones sin estrés y el menor valor ($2,32 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) el genotipo BGSP 52 en condiciones de estrés (tabla 3).

Temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$)

Los resultados no presentaron diferencias significativas para el tratamiento ($p < 0,8499$) y la interacción entre trata-

miento y genotipos ($p < 0,2558$). Sin embargo las diferencias entre genotipos fueron significativas ($p < 0,0001$) (tabla 2). Las entradas BGSP 715, BGSP 716, BGSP 67 y BGSP 750 presentaron mayores temperaturas ($30,5$; $30,3$, $30,2$ y $30,2^{\circ}\text{C}$) y BGSP 43 denominada "Stoneville 508" exhibió el menor valor ($28,0^{\circ}\text{C}$).

Contenido de agua relativo (%)

El CAR presentó diferencias significativas para tratamiento ($p < 0,0001$), genotipo ($p < 0,0112$) e interacción ($p < 0,0027$) (tabla 2). Los valores medios alcanzados en condiciones de estrés fueron de $44,3\%$ y sin estrés de $81,8\%$. El genotipo BGSP 52 presentó mayor turgencia en el tratamiento sin estrés ($90,2\%$), y presentó diferencias significativas con BGSP 43, BGSP 463, BGSP 715, BGSP 716 y BGSP 765. El genotipo BGSP 715 presentó el CAR más bajo dentro del control, con un promedio de $68,5\%$. Los genotipos que presentaron mayor valor de CAR sin presentar diferencias significativas en condiciones bajo estrés hídrico fueron BGSP 43 ($52,8\%$), BGSP 514 ($52,65\%$) y SP 48114 ($52,32\%$) y en relación con los genotipos más afectados fueron BGSP 805 quien presentó el menor valor ($30,9\%$) seguido de BGSP 750 ($33,41\%$), BGSP 52 ($37,80\%$), BGSP 392 ($38,34\%$), BGSP 73 ($40,57\%$), BGSP 716 ($40,76\%$), BGSP 765 ($40,96\%$), BGSP 156 ($41,05\%$) y BGSP 799 ($41,46\%$) (tabla 3).

	Ce ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	T ($^{\circ}\text{C}$)	CAR (%)
Tratamiento	0,0001***	0,8499ns	0,0001***
Genotipo	0,0001***	0,0001***	0,0112**
Tratamiento x Genotipo	0,0001***	0,2558ns	0,0027**

Tabla 2. Pruebas de hipótesis secuenciales para las variables conductancia estomática (Ce), temperatura foliar (T) y contenido de agua relativo (CAR).

*, **, ***, Significado de la prueba F a $p \leq 0,05$, $0,01$ o $0,0001$, respectivamente; ns, indican no significancia.

Heredabilidad en sentido amplio

A partir de los componentes de la varianza se determinó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) (tabla 4). Los componentes genéticos para Ce expresaron mayor variabilidad en el tratamiento sin estrés hídrico en comparación al tratamiento con estrés, indicando que la variabilidad genética disponible en condiciones de estrés hídrico disminuye. La heredabilidad en sentido amplio en condiciones de estrés hídrico ($H^2 = 0,035$) fue baja. El $3,5\%$ de la variación fenotípica se debió al genotipo, mientras que $96,5\%$ al ambiente. Distinta fue la respuesta para buenas condiciones de humedad donde el 32% del fenotipo se debió a la expresión del genotipo y el 68% al ambiente ($H^2 = 0,32$).

Los componentes genéticos y fenotípicos en CAR mostraron similar variabilidad en condiciones de estrés hídrico y sin

Genotipo	Ce (mmol m ⁻² s ⁻¹)		CAR (%)	
	Sin estrés	Con estrés	Sin estrés	Con estrés
BGSP 43	87,22def	6,30g	77,35bc	52,81d
BGSP 52	85,87def	2,32g	90,20a	37,80ghi
BGSP 67	53,98efg	3,08g	84,17ab	51,58de
BGSP 73	61,63efg	2,50g	80,58ab	40,57fghi
BGSP 156	142,92bcde	2,95g	83,17ab	41,05efghi
BGSP 392	128,35cde	3,10g	84,35ab	38,34ghi
BGSP 463	107,83cdef	3,53g	78,13bc	43.86defgh
BGSP 475	91,52def	4,88g	80,77ab	50,94defg
BGSP 507	253,32a	7,05g	85,44ab	48.50defg
BGSP 514	99,55cdef	2,32g	83,37ab	52,65d
BGSP 715	67,23efg	2,55g	68,46c	43.28defgh
BGSP 716	115,6cde	2,82g	79,20bc	40,76fghi
BGSP 735	97,15cdef	4,30g	81,08ab	46.96defg
BGSP 750	12,28g	2,60g	81,65ab	33,41hi
BGSP 765	179,75abcd	3,68g	78,83bc	40,98fghi
BGSP 799	269,25a	2,38g	88,07ab	41,46efghi
BGSP 803	228,45ab	3,28g	83,21ab	50,00defg
BGSP 804	135,17bcde	2,50g	80,53ab	48.50defg
BGSP 805	192,80abc	2,73g	82,75ab	30,90i
SP 48114	97,48cdef	11,55g	84,59ab	52,32d

Tabla 3. Interacción entre Tratamiento y Genotipos para los parámetros conductancia estomática (Ce) y contenido de agua relativo (CAR). *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

estrés, siendo la heredabilidad ($H^2 = 0,085$) en condiciones de estrés hídrico baja a nula, es decir, que el 8,5% de variación fenotípica se debió al genotipo y el 91,5% al ambiente. En condiciones de buena disponibilidad hídrica (sin estrés) el CAR presentó una heredabilidad ($H^2 = 0,081$) similar a la anterior.

Variables	Tratamiento	σ^2_G	σ^2_F	H^2
Ce	Sin estrés	3409,45	10662,25	0,32
	Con estrés	0,9	25,55	0,035
CAR	Sin estrés	20,08	245,18	0,081
	Con estrés	9,64	112,25	0,085

Tabla 4. Varianzas genética (σ^2_G), fenotípica (σ^2_F) y heredabilidad (H^2) en sentido amplio en los dos tratamientos para contenido de agua relativo (CAR) y conductancia estomática (Ce).

Análisis multivariado

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con los datos estandarizados de las variables respuesta, donde la variabilidad total explicada por dos componentes

principales fue 90,5%. Las variables que definieron el componente principal 1 (CP1) fueron CAR y Ce, mientras que la T definió el componente principal 2 (CP2) (figura 1). Además se obtuvieron dos grupos significativamente diferentes para el factor A, tratamiento principal: sin estrés y con estrés hídrico y con dispersiones en condiciones sin estrés por los genotipos BGSP 43 (23) y BGSP 52 (40) y también en condiciones de estrés (3) y (8) respectivamente. La significancia estadística de estas diferencias pudo comprobarse a través de elipses de confianza y p-valores ($p < 0,05$) de la correlación entre grupos, es decir, que las coordenadas de los tratamientos fueron significativamente diferentes (tabla 5)

Componente principal 1		
	R ²	p-valor
Tratamiento	0,8438	6,653532 e-17
	Estimado	p-valor
Sin estrés	1,202352	6,653532 e-17
Con estrés	-1,202352	6,653532 e-17

Tabla 5. Prueba de significancia de la correlación de la variable categórica Tratamiento con la CP1 (Test de Student).

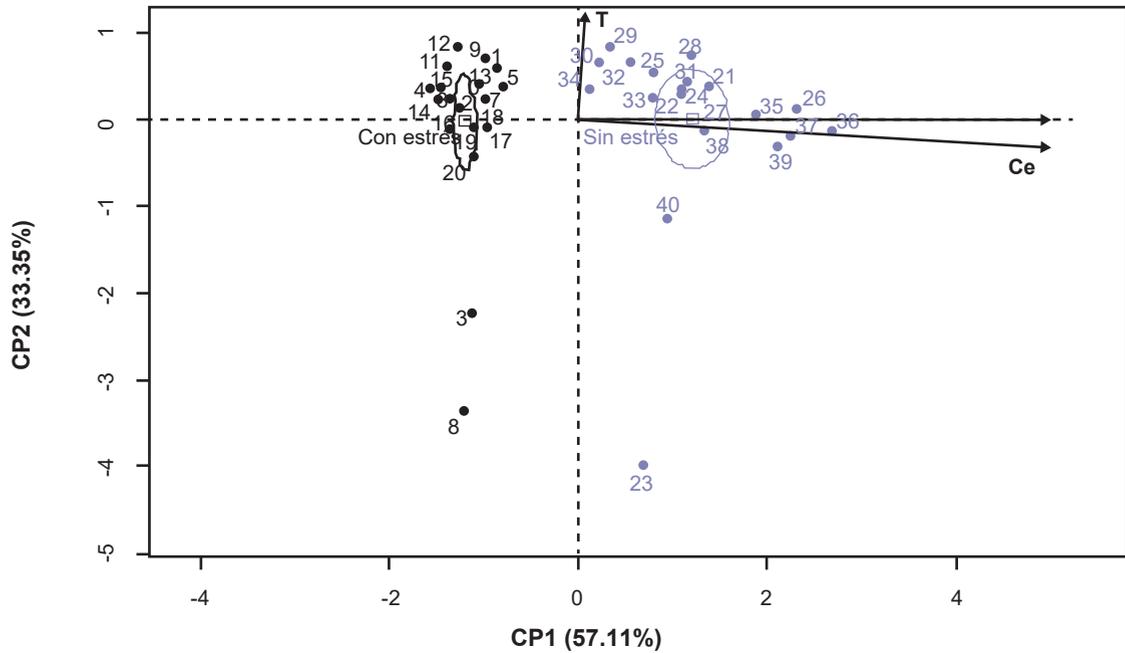


Figura 1. Gráfico de las variables conductancia estomática (Ce), temperatura foliar (T) y contenido de agua relativo (CAR) y diferencias significativas (elipses) en los tratamientos sin estrés y con estrés hídrico en las CP1 y CP2.

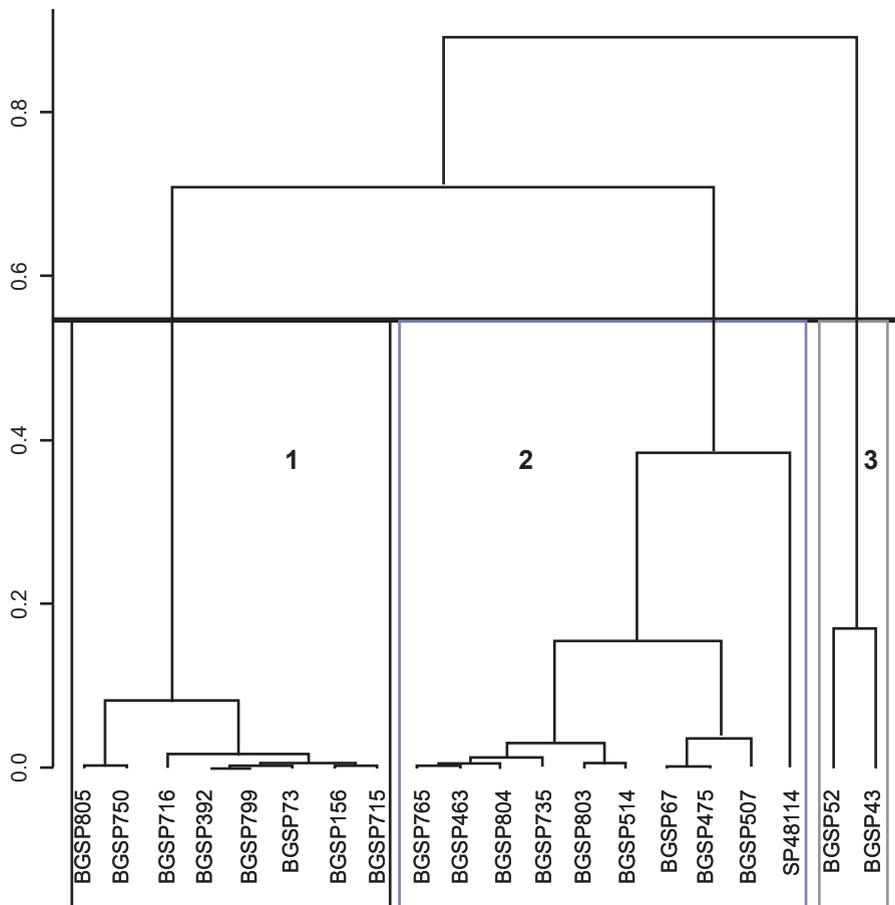


Figura 2. Árbol jerárquico de los genotipos en condiciones de estrés sobre la CP1 y CP2.

Variables	Grupos	v. test	Media en la categoría	Media general	p-valor
CAR	1	-3,13	38,72	44,32	0,001
CAR	2	2,93	48,6	44,32	0,003
T	3	-4,1	28,32	29,83	3,96 x10 ⁻⁶

Tabla 6. Descripción de los grupos a través de las variables de contenido de agua relativo (CAR) y temperatura foliar (T).

Media de la categoría: describe el promedio para las variables que caracterizan cada grupo; Media general: el promedio para la variable para el conjunto total de datos; p-valor correspondiente a la hipótesis de que la media de la categoría es igual a la media global. Si el p-valor es menor a 0,05 la media del grupo es significativamente mayor o menor a la media global, según el signo del test de valor (v. test). El test de valor es considerado una desviación "estandarizada" entre la media de los individuos de una categoría y la media global. Según el signo indica si la desviación del grupo es con valores menores o mayores.

presentando el grupo sin estrés coordenadas mayores en la CP1, es decir, valores más altos de Ce y CAR.

Una vez realizado el ACP para todos los individuos se analizó únicamente el tratamiento con estrés hídrico utilizando la misma metodología. El objetivo de este análisis fue visualizar la distribución de los genotipos de acuerdo a los valores que mostraron las variables en conjunto.

La variabilidad total explicada por ambos componentes fue del 83,3%. Las variables respuesta se comportaron de manera similar que en el análisis anterior, es decir, que la CP1 fue definida por Ce y CAR, y la CP2 por la T.

El árbol jerárquico o dendrograma dividió a los genotipos en tres grupos (figura 2). El nivel óptimo sugerido por este método (presentado por una línea negra sólida) también es de tres. De esta manera, el grupo uno, mostrado por un recuadro negro, presentó los siguientes genotipos: el 37,5% de los genotipos fueron originarios de Argentina (BGSP 805, BGSP 799, BGSP 392) mientras que 62,5% restantes por poblaciones de China (BGSP 750), Siria (BGSP 716), EUA (BGSP 156), Costa de Marfil (BGSP 73) y Pakistán (BGSP 715), en igual proporción. Para el grupo dos (recuadro de color rojo), el 50% de las poblaciones fueron provenientes de Argentina (SP 48114, BGSP 804, BGSP 803, BGSP 507) y el otro 50% de China (BGSP 765), EUA (BGSP 463), Australia (BGSP 514), Costa de Marfil (BGSP 67) y URSS (BGSP 735). Con respecto al grupo tres (recuadro de color verde), estuvieron conformadas por los genotipos BGSP 43 de origen americano y BGSP 52 de origen brasilero teniendo en común que son materiales obsoletos, siendo el grupo más uniforme respecto de la población. Los porcentajes de los dos primeros grupos sugieren que las características fisiológicas presentaron mayor peso en separar a los genotipos en tres grupos y el agrupamiento no correspondió al origen de la población, ya que en los diferentes grupos se encuentran genotipos provenientes de todos los continentes y poblaciones diversas en cuanto a si corresponde a un material moderno, obsoleto, línea y local.

En la tabla 6 se muestra la descripción de los grupos a través de las variables. Los genotipos del grupo uno se caracterizan por tener un CAR menor (38,72%) a la media general (44,32%), las del grupo dos un CAR mayor (48,6%) a la media general (44,32%) y las del grupo tres una T menor (28,32°C) a la media general (29,83 °C).

La descripción de los grupos por las CP indicaron que los genotipos del grupo uno tienen menores coordenadas en la CP1, es decir, valores menores de CAR y Ce; los genotipos del grupo dos que tienen coordenadas mayores en la CP1, es decir, mayor valor de CAR y Ce, y los del agrupamiento tres tienen coordenadas menores en la CP2 respecto de la media general presentando valores significativamente menores de T.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estrés hídrico es un fenómeno complejo que afecta a la fisiología, (Grimes y El-Zik, 1990), al crecimiento y a la productividad en las plantas de algodón (Chu *et al.*, 1995). En el presente trabajo se pudo comprobar que las variables fisiológicas Ce y CAR fueron las más afectadas por el estrés hídrico. El valor promedio de los genotipos en la Ce fue 3,82 mmol m⁻²s⁻¹ para el tratamiento con estrés y 125,37 mmol m⁻²s⁻¹ para el control, indicando el cierre de los estomas en condiciones de déficit de humedad (Pagán Rubio, 2012). Similares respuestas encontraron Pilon *et al.* (2012), cuando estudiaron el efecto del estrés hídrico sobre la termosensibilidad del Fotosistema II en cultivares de algodón, la Ce fue afectada significativamente en los cultivares de Pima 32 (11,82 mmol m⁻²s⁻¹), Siokra L23 (12,09 mmol m⁻²s⁻¹), DP0912 (28,40 mmol m⁻²s⁻¹) y T1521 (19,62 mmol m⁻²s⁻¹) en comparación con el control que mostró valores más altos (55,63 mmol m⁻²s⁻¹; 157,43 mmol m⁻²s⁻¹; 136,15 mmol m⁻²s⁻¹ y 114,89 mmol m⁻²s⁻¹). En el presente trabajo la interacción entre tratamiento y genotipos demostró que la respuesta de la Ce en condiciones de estrés hídrico fue similar entre genotipos, con valor mínimo y máximo de 2,32 y 11,55 mmol m⁻²s⁻¹, respectivamente; sin embargo en buenas condiciones de humedad, se observó mayor variabilidad (mínimo y máximo de 12,28 y 269,25 mmol m⁻² s⁻¹, respectivamente (tabla 5). Estos resultados sugieren que para detectar respuestas diferenciadas o variabilidad genética disponible en la Ce en los genotipos bajo condiciones de estrés hídrico, habría que llevar el tratamiento a un nivel algo mayor de humedad, es decir, un estrés más leve, ya que con estrés intenso las características genéticas se uniforman en su respuesta. Harris (1973), Bielora y Hopmans (1975) también informaron, para experimentos en macetas, que la Ce fue signifi-

cativamente disminuida en condiciones de déficit hídrico; otros investigadores han reportado cierre estomático por esta causa en algodón y otros cultivos en macetas (Boyer, 1970). Los experimentos de campo han demostrado que la Ce del algodón se adapta al estrés hídrico; Paytas (2009) halló asociación en la disminución de Ce con el aumento de déficit hídrico al estudiar el efecto temprano del estrés en el crecimiento, desarrollo y rendimiento en algodón de alta retención de cápsulas a campo y Ackerson *et al.* (1977) reportaron que la Ce en algodón cultivado en el campo es ligeramente afectada ya que los estomas de las hojas no se cerraron completamente, incluso bajo potenciales hídricos muy bajos.

Coincidiendo con lo anteriormente expuesto, la heredabilidad en sentido amplio para la Ce fue baja en condiciones de estrés hídrico, es decir, el 3,5% de la variación fenotípica se debió a diferencias entre genotipos y el 96,5% a efectos ambientales. Distinta fue la respuesta para condiciones sin estrés donde el 32% de la variación fenotípica observada se debió a la existencia de diferencias entre los genotipos y el 68% atribuido a las variaciones del ambiente. La herencia de la Ce fue estudiada en la variedad de algodón Pima por Percy *et al.* (1996), quienes demostraron que es un tipo de herencia compleja que incluye desde un simple modelo aditivo-dominante a un modelo donde se presentan interacción epistática/digénica. Estos mismos autores reportaron estimaciones de heredabilidad en sentido amplio para Ce que variaron desde 0,16 hasta 0,44. En poblaciones interespecíficas obtenidas por la cruz de *G. hirsutum* (americano) x *G. barbadense* (Pima o Tangüis), Ulloa *et al.* (2000) demostraron la presencia de efectos aditivos, como así también de dominancia para la Ce en estudios efectuados a través de QTLs. Los alelos de los marcadores dominantes de los padres de tipo algodón americano contribuyeron a valores medios más altos de Ce y esto sugirió, además, que los genes de algodón americano podrían contribuir al aumento de Ce en líneas de Pima en programas de mejoramiento avanzados. Además, la Ce en el algodón está determinada genéticamente y se ha demostrado que se asocia con la resistencia al calor y rendimientos más altos. En general, el estrés por altas temperaturas reduce la Ce y la variabilidad genética disponible (Rahman, 2005). Del mismo modo podría comportarse ante el déficit hídrico debido a que no existe un mecanismo de resistencia al estrés abiótico unificado para la sequía a nivel de toda la planta o a nivel de gen individual (Blum, 2004).

Con respecto al CAR, la disminución en sus valores en respuesta a la sequía ha sido observada en una amplia variedad de especies. Así lo han demostrado Nayyar y Grupta (2006) trabajando en trigo y maíz, y Jamal *et al.* (2014), en algodón arbóreo, entre otros. Investigaciones previas (Kaiser, 1987; Robinson., 1988; Cornic *et al.*, 1989) han indicado que el estrés hídrico comienza a inducir restricciones a nivel de mesófilo, disminuyendo la fotosíntesis cuando el CAR en tejido de la hoja alcanza entre el 50 y 70%. Al mismo tiempo se considera a los genotipos tolerantes aquellos que pueden mantener el CAR alto en comparación con los sensibles (Ananthi *et al.* 2013). Los resultados mostraron

menor valor promedio de CAR en los genotipos bajo estrés hídrico (44,3%) contrario a un alto valor promedio sin estrés (81,8%). Comportamiento similar encontraron Jamal *et al.* (2014) cuando estudiaron el efecto del estrés por sequía sobre el crecimiento y la fisiología en *G. arboreum* registrando menor CAR en las plantas que crecieron en condiciones de estrés hídrico (44,3%) en comparación con las que lo hicieron sin estrés hídrico (70,2%). La interacción aquí hallada entre tratamiento principal y genotipos indicó que estos se comportaron de manera diferente según la condición de humedad del suelo en que crecieron. Los valores de CAR obtenidos para los genotipos en condiciones de buena disponibilidad hídrica en el suelo variaron entre 68,4 y 90,2% y en condiciones de estrés hídrico entre 30,9 y 52,8%. Es interesante mencionar respecto al CAR y en relación con el tipo de hoja que el genotipo de origen australiano BGSP 514, denominado Siokra, de hojas muy lobuladas, presentó un valor de CAR alto (52,6%) y bajos valores de Ce ($2,32 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en condiciones de estrés, respecto a los demás genotipos de hojas normales. Pettigrew *et al.* (1993) encontraron que las plantas de hoja okra y súper okra tenían valores de Ce más bajos que las isolíneas de hojas normales a potenciales altos de agua, y esto se atribuyó a la menor densidad de estomas presentes en la cara abaxial de los genotipos de hoja okra (Wellsy Meredith Jr., 1986). Resultados similares fueron reportados por Karami *et al.* (1980) y Nepomuceno *et al.* (1998), quienes también informaron que los genotipos de algodón de hojas súper okra fueron capaces de mantener alta turgencia en las hojas a potenciales osmóticos más bajos en comparación con las plantas de hojas normales. También las plantas de hoja tipo okra y súper okra exhibieron mayores tasas fotosintéticas a potenciales hídricos bajos en comparación con las plantas de hoja tipo normales en experimentos de invernadero y de campo (Karami *et al.*, 1980; Nepomuceno *et al.*, 1998; Pettigrew, 2004).

Para determinar la existencia de un comportamiento diferente entre los genotipos en la variable CAR, se estimaron los valores de H^2 encontrándose que estos fueron bajos en ambas condiciones de humedad. La variación de los fenotipos en condiciones de estrés fue determinada por las variaciones del ambiente en un 91,9% y tan solo un 8,1% por las diferencias entre los genotipos.

Las mediciones de temperatura foliar (T) y las temperaturas del dosel se han establecido como buenos indicadores de la tolerancia de las plantas a la sequía y su utilización permite cuantificar el déficit de la planta (Ko y Piccinni, 2009). En el presente trabajo no hubo diferencias significativas para tratamientos ni interacción, sin embargo las diferencias entre los genotipos sí fueron significativas. Las T más altas fueron observadas en BGSP 715, BGSP 716, BGSP 67 y BGSP 750 y las más bajas en BGSP 43 y BGSP 52. No obstante, Pettigrew (2004) encontró diferencias significativas en la temperatura del dosel cuando evaluó las consecuencias fisiológicas del estrés hídrico en algodón a campo con riego y sin riego sobre ocho genotipos en el sudoeste de EE. UU.; los resultados mostraron que en las plantas que crecieron en secano las temperaturas

registradas fueron mayores (35,2 °C) que las que crecieron bajo riego (30,7 °C).

El ACP para el conjunto de datos presentó alta correlación entre Ce y CAR representada por la CP1, explicando ambas variables el 57,11% de la variabilidad total (figura 1). Asimismo, Quisenberry *et al.* (1982) encontraron una correlación significativa entre el CAR, el cierre de estomas y tasas de crecimiento promedio de los genotipos de algodón en condiciones de estrés hídrico a campo. Los resultados descriptos para CAR fueron similares a los informados para la acerola o cereza de Barbados, donde Nogueira (1997) propuso el potencial hídrico foliar como indicador de tolerancia a la sequía; esta variable también fue considerada para la selección de variedades de maní (Nogueira *et al.*, 1998). También, Millar *et al.* (1971) enfatizaron que se ha dado preferencia a las determinaciones del potencial total del agua en la planta, porque esta influye más directamente en los procesos metabólicos que cualquier otro parámetro de evaluación del déficit hídrico. Por su parte, Clark y Hiler (1973) constataron que el potencial del agua en la hoja resultaba ser mejor indicador del estado hídrico de la planta que la resistencia difusiva estomática o temperatura foliar. Sin embargo, Acevedo *et al.* (1998) relataron que las mediciones del potencial hídrico, aisladamente, no dan información suficiente sobre el impacto del estrés hídrico en los procesos fisiológicos mediados por el contenido de agua de los tejidos. Por el contrario, Ananthi *et al.* (2013) sostienen que los genotipos tolerantes mantienen en sus hojas un alto CAR y actividad fotosintética con respecto a los sensibles. La temperatura definió la CP2 y explicó el 29,7% de la variabilidad total. Según Armani *et al.* (1996) la Ce tiene una relación directa sobre el enfriamiento por transpiración y existe una fuerte relación entre la Ce y la T, por lo tanto ambos se ven afectados por muchos de los mismos factores ambientales y fisiológicos (Reynolds *et al.*, 2012). El esfuerzo de la planta para conservar el agua también podría conducir a una mayor temperatura foliar (Carmo-Silva *et al.*, 2012; Pettigrew, 2004; Shahenshah y Isoda, 2010), viéndose disminuida la capacidad de enfriamiento de la hoja por evaporación (Radin *et al.*, 1994); sin embargo en el presente estudio no se pudo determinar tales relaciones. Se pudo comprobar mediante un análisis de significancia que las coordenadas de los tratamientos con estrés y sin estrés fueron significativamente diferentes en relación con las variables CAR y Ce (figura 1), presentando el grupo sin estrés mayores valores promedios de CAR y Ce en relación con el grupo con estrés hídrico, reforzando lo anteriormente explicitado de que en condiciones hídricas óptimas hay mayor contenido hídrico en hoja y apertura de estomas; además en condiciones de buena disponibilidad de agua, la regulación de la Ce mantiene un nivel óptimo de las concentraciones de CO₂ interno lo cual promueve la fotosíntesis. Al contrario, la reducción del CAR es una pérdida de turgencia de las células que conlleva al cierre de estomas y la reducción de la tasa fotosintética (Lv *et al.*, 2007; Kramer y Boyer, 1995). Además, el cierre de estomas es debido a una señalización del ácido abscísico en cascada que provoca reducción en la turgencia que guardan las células. Esta es una respuesta fisiológica primaria que la planta de algodón provoca ante el estrés por sequía

(Ackerson, 1980), con la consiguiente disminución de la Ce para minimizar la pérdida transpiracional de agua (Chaves *et al.*, 2003).

Para discriminar con mayor detalle las características evaluadas de los genotipos en el tratamiento de estrés hídrico, se utilizó el método de agrupamiento o dendograma, empleado por Sokal y Sneath (1963), conocido hoy por método de agrupación jerárquica o partición en grupos (Husson *et al.* 2010). Él dividió a los genotipos en tres agrupamientos (figura 2): el grupo uno se caracterizó por tener un CAR menor (38,72%) a la media general (44,32%), las del grupo dos un CAR mayor (48,6%) a la media general (44,32%) y las del grupo tres una T menor (28,32 °C) a la media general (29,83 °C) (tabla 6). Además, los tres grupos fueron conformados en función a los componentes principales 1 y 2, presentando el grupo uno menores valores de CAR y Ce, el grupo dos valores mayores de CAR y Ce, y por último el grupo tres menor T. Los genotipos más deseables por su desempeño en condiciones de estrés hídrico por presentar mayor CAR y Ce serían los pertenecientes al grupo dos: BGSP 756, BGSP 463, BGSP 804, BGSP 735, BGSP 803, BGSP 514, BGSP 67, BGSP 475, BGSP 507 y SP 48114.

Estos resultados lograron obtener la caracterización de los 20 genotipos evaluados pertenecientes al Banco de Germoplasma de Algodón de la EEA Sáenz Peña de INTA (Chaco, Argentina) por su tolerancia al estrés hídrico en etapa de crecimiento vegetativo del cultivo. Se considera que el trabajo realizado es un primer paso en la contribución para la obtención de líneas o variedades más adaptadas a esta condición ambiental. Como perspectiva a futuro se pretende evaluar estos genotipos a campo en distintos ambientes para mejorar las estimaciones de las relaciones genéticas.

AGRADECIMIENTOS

A INTA EEA Sáenz Peña, INTA EEA Las Breñas, Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), proyectos REDGEN1137021, PNIND-1108082.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO, E.; SILVA, H.; SILVA, P. 1998. Tendencias actuales de la investigación en la resistencia al estrés hídrico de las plantas cultivadas. Boletín Técnico Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile. 49:1-29.
- ACKERSON, R.C. 1980. Stomatal response of cotton to water stress and abscisic acid as affected by water stress history. *Plant Physiol* 65, 455-459.
- ACKERSON, R.C.; KRIEG, D.R.; HARING, C.L.; CHANG, N. 1977. Effects of plant water status on stomatal activity, photosynthesis, and nitrate reductase activity of field grown cotton. *Crop Sci.* 17:81-84.
- ANANTHI, K.; VIJAYARAGHAVAN, H.; KARUPPAIYA, M.; ANAND, T. 2013. Drought-induced Changes in Chlorophyll Stability Index, Relative Water Content and Yield of Cotton Genotypes. *Insight Botany* 3, 1-5.

- ARMANI, I.; FHISCHER, R.; REYNOLDS, M. 1996. Evaluation of canopy temperature as a screening tool heat tolerance in spring wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 176, 119–129.
- ARTURI, M.J. 1984. El Algodón. Mejoramiento Genético y Técnicas de su cultivo 1.º ed. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina, 179 p.
- BASAL, H.; BEBELI, P.; SMITH, C.W.; THAXTON, P. 2003. Root growth parameters of converted race stocks of upland cotton and two BC2F2 populations. *Crop Sci.* 43:1983–1988.
- BLUM, A. 2004. The physiological foundation of crop breeding for stress environments. : Proc. World Rice Research Conf., Tsukuba, Japan. Manila. The Philippines: International Rice Research Institute. 456–458 pp.
- BIELORAI, H.; HOPMANS, P.A.M. 1975. Recovery of leaf water potential, transpiration, and photosynthesis of cotton during irrigation cycles. *Agron. J.* 67:629–632.
- BOYER, J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiol.* 46:233–235.
- BRUBAKER, C.L.; WENDEL, J.F. 1994. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; *Malvaceae*) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *American Journal of Botany* 81, 1309–1326.
- BRUBAKER, C.L.; BOURLAND, F.M.; WENDEL, J.F. 1999. The origin and domestication of cotton. En: SMITH, C.W.; COTHREN, J.T. (Eds.). *Cotton. Origin, history, technology, and production*. John Wiley & Sons, Nueva York. 3–31 pp.
- CARMO-SILVA, A.; GORE, M.; ANDRADE-SANCHEZ, P.; FRENCH, A.; HUNSAKER, D.; SALVUCCI, M. 2012. Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environmental and Experimental Botany* 83, 1–11.
- CARTER, T. 1989. Breeding for drought tolerance in Soybean: Where do we stand? World Research Conference IV. Asociación Argentina de la Soya, Buenos Aires Argentina.
- CHAVES, M.M.; MAROCO, P.P.; PEREIRA, J.S. 2003. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Funct. Pl. Biol.*, 30, 239–64.
- CHU, C.C.; HENNEBERRY, T.J.; AKEY, D.H.; NARANJO, S.E.; PERKINS, H.H.; PRABHAKER, N.; ANDMACKEY, B.E. 1995. Silverleaf whitefly: Development of an action threshold for chemical control on cotton. En: HERBER, D.J.; RICHTER, D.A. (Ed.). Proc. Beltwide Cotton Conf., San Antonio, TX. 4–7. Natl. Cotton Council Am., Memphis, TN. 873–874 pp.
- CLARK, R.N.; HILER, E.A. 1973. Plant measurements as indicators of crop water deficits. *Crop Science* 13, 466–469.
- CORNIC, G.; GOUALLEC, J.; BRIANTAIS, J.; HODGES, M. 1989. Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C₃ plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Elatipstema repens* (Lour) Hall f.). *Planta* 177, 84–90.
- DELSIN, E. 2015. Pronóstico de estabilidad en la producción mundial de algodón. INTA, Argentina. (Disponible: <http://inta.gob.ar/documentos/pronostico-de-estabilidad-en-la-produccion-mundial-de-algodon> verificado: 2015).
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar> verificado: 2014).
- EHLERINGER, J.R.; COOPER, T.A. 1992. On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. *Plant, Cell and Environment* 15, 301–306.
- EVANS, L.T. 1983. Fisiología de los cultivos. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 402 p.
- FALCONER, D.S. 1981. Introduction to quantitative genetics. 2.ª ed. Longmans, Londres. 340 p.
- FAMBRINI, M.; VERNIERI, P.; TONCELLI, M.L.; ROSSI, V.D.; PUGLIESI, C. 1995. Characterization of a wilted sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant. III. Phenotypic interaction in reciprocal grafts from wilted mutant and wild-type plants. *J. Exp. Bot.* 46, 525–530.
- FRANCA, M.G.C.; THI, A.T.P.; PIMENTAL, C.; ROSSI, V.D.; FODIL, Y.Z.; LAFFARY, D. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 43, 227–237.
- GARDNER, W.R.; GARDNER, H.R. 1983. Principles of water management under drought conditions. *Agric. Water Manage* 7, 143–155.
- GÓMEZ, G. 2007. Estimación de la diversidad genética mediante marcadores Microsatélites en entradas de Algodón (*Gossypium hirsutum* L.) del Banco de germoplasma del INTA. [Tesis Magister] Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 80 p.
- GRIMES, D.W.; EL-ZIK, K.M. 1990. Cotton. En: STEWART, B.A.; NIELSEN, D.R. (Eds.). *Irrigation of Agricultural Crops*. Agronomy series n.º 30. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin. 741–773.
- HARRIS, D.G. 1973. Photosynthesis, diffusion resistance and relative plant water content of cotton as influenced by induced water stress. *Crop Sci.* 13:570–572
- HUSSON, F.; JOSSE, J.; PAGES, J. 2010. Principal component methods – hierarchical clustering - partitional clustering: why would we need to choose for visualizing data? Technical Report Agrocampus. (Disponible: www.agrocampus-ouest.fr/math/ verificado: 2016).
- IQBAL, K.; AZHAR, F.M.; KHAN, I.A.; ULLAH, E. 2010. Assessment of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm under water stress condition. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 251–255.
- JAMAL, A.; SHAHID, M.; AFTAB, B.; RASHID, B.; SARWAR, M.; MOHAMED, B.; HASSAN, S.; HUSNAIN, T. 2014. Water stress mediated changes in morphology and physiology of *Gossypium arboreum* (var FDH-786) *Journal of Plant Sciences* 2 (5), 179–186.
- KAISER, W. 1987. Effect of water stress on photosynthesis capacity. *Physiol. Plant.* 71, 142–149.
- KARAMI, E.; KRIEG, D.R.; QUISENBERRY, J.E. 1980. Water relations and carbon-14 assimilation of cotton with different leaf morphology. *Crop Sci.* 20, 421–426.
- KO, J.; PICCINNI, G. 2009. Corn yield responses under crop evapotranspiration-based irrigation management. *Agric. Water Manage* 96, 799–808.
- KRAMER, P.J. 1983. Water deficits and plant growth. En: KRAMER, P.J. (Ed.). *Water Relations of Plants*. Academic Press, Nueva York, EUA. 342–389 pp.
- KRAMER, J.K.; BOYER, J.S. 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, California, 495 p.
- LEWITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stress. Vol. II. Water, Radiation, Salt and Others. Academic Press, Nueva York. 395–434 pp.
- LOOMIS, R.S.; CONNOR, D.J. 1992. *Crop Ecology: Productivity and management in agricultural systems*. Cambridge University Press, Nueva York, 538 p.
- LV, S.; YANG, A.; ZHANG, K.; WANG, L.; ZHANG, J. 2007. Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Mol. Breed.* 20, 233–248.
- MARIOTTI, J.A. 1986. *Fundamentos de genética biometría. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal*, 152 p.

- MILLAR, A.A.; GARDNER, W.R.; GOLTZ, S.M. 1971. Internal water status and water transport in seed onion plants. *Agronomy Journal* 63, 779–784.
- MÖLLER, M.; ALCHANATIS, V.; MERON, M.; TSIPRIS, J.; NAOR, A.; OSTROVSKY, V.; SPRINTSIN, M.; CHOEN, S. 2007. Use of thermal and visible imagery for estimating crop water status of irrigated grapevine. *J Exp. Bot.* 827–838.
- NAYYAR, H.; GUPTA, D. 2006. Differential sensitivity of C₃ and C₄ plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 58, 106–113.
- NEPOMUCENO, A.L.; OOSTERHUIS, D.M.; STEWART, J.M. 1998. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Env. Exp. Bot.* 40, 29–41.
- NOGUEIRA, R.J.M.C. 1997. Expressões fisiológicas da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) em condições adversas. [Tese Doutorado], UFSCar, São Carlos, SP. 207 p.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, R.C.; BEZERRA NETO, E.; SANTOS, V.F. 1998. Comportamento fisiológico de duas cultivares de amendoim submetidas a diferentes regimes hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33 (12), 1963–1969.
- PARKHI, V.; KUMAR, V.; SUNILKUMAR G.; CAMPBELL, L.M.; RATHORE, K.S. 2009. Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Springer Science* 23, 625–639.
- PAYTAS, M.; MIERES, L.; LONGHI, T.; AGRETTI, S.; DEYKE, F.; GREGORET, O. 2014. Evaluación de diferentes estrategias de de riego y su efecto en los componentes de rendimiento de algodón. *Publicación anual APPA N.º 14*, 30–33.
- PAYTAS, M. 2009. Early water stress on growth, development and yield of high retention cattan. [PhD thesis]. The University of Queensland, Australia.
- PERCY, R.G.; LU, Z.; RADIN, J.W.; TURCOTTE, E.L.; ZEIGER, E. 1996. Inheritance of stomatal conductance in cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Physiol. Plant.* 96, 389–394.
- PETTIGREW, W.T.; HEITHOLT, J.J.; VAUGHN, K.C. 1993. Gas exchange differences and comparative anatomy among cotton leaf-type isolines. *Crop Sci.* 33:1295–1299.
- PETTIGREW, W. 2004. Physiological consequences of moisture deficit stress in cotton. *Crop Sci.* 44,1265–1272.
- PILON, C.; OOSTERHUIS, D.; LOKA, D. 2012. Effect of Water-Deficit Stress on Photosystem II Thermosensitivity in Cotton. En: OOSTERHUIS, D.M. (Ed.) *Summaries of Arkansas Cotton Research*. Arkansas Agricultural Experiment Station, University of Arkansas System, Division of Agriculture. Arkansas. 31–35 pp.
- QUISENBERRY, J.; ROARK, B.; CMICHAEL, B. 1982. Use of transpiration decline curves to identify drought-tolerant cotton germplasm. *Crop Sci.* 22, 918–922.
- R, DEVELOPMENT CORE TEAM. 2011. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. (Disponibile: <http://www.R-project.org/> verificado: abril de 2011).
- RADIN, J.W.; LU, Z.; PERCY, R.G.; ZEIGER, E. 1994. Genetic variability for stomatal conductance in Pima cotton and its relation to improvements of heat adaptation. *Proceedings of the National Academy of Science, EUA.* 91, 7217–7221.
- RAHMAN, H. 2005. Genetic analysis of stomatal conductance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under contrasting temperature regimes. *The Journal of Agricultural Science* 143 (2-3), 161–168.
- REYNOLDS, M.; PASK, A.; MULLAN, D.; CHAVEZ, Y.; DULANTO, P. 2012. *Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoque interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo*. México, D.F., CIMMYT, 174 p.
- ROARK, B.; QUISENBERRY, J.E. 1977. Evaluation of cotton germplasm for drought resistance. Beltwide cotton production and research conference, National Cotton Council of America, Memphis, TN, EUA, 49–50.
- ROBINSON, J. 1988. Does O₂ production occur within chloroplasts in vivo? *Physiol. Plant* 72, 666–680.
- ROFMAN, A. 1999. Economías regionales. Modernización productiva y exclusión social en las economías regionales. *Revista Realidad Económica* 162, 107–136.
- SALISBURY, F.; ROSS, C. 1985. *Plant Physiology*. 3th Ed. Wadsworth. California, EUA, 540 p.
- SCHONFELD, M.; JOHNSON, R.; CARVER, B. 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci* 28, 526–553.
- SHAHENSHAH; ISODA, A. 2010. Effects of water stress on leaf temperature and chlorophyll fluorescence parameters in cotton and peanut. *Plant Prod. Sci.* (3): 269–278.
- SIVUKAMAR, M.; SHAW, R. 1978. Relative evaluation of water stress indicators of soybeans. *Agron. J.* 70, 619–623.
- SOKAL, R.; SNEATH, P. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. WH Freeman & Co. 359 p.
- ULLOA, M.; CANTRELL R. G., PERCY R. G, ZEIGER E., LU Z. 2000. QTL Analysis of Stomatal Conductance and Relationship to Lint Yield in an Interspecific Cotton. *Journal of Cotton Science* 4:10–18
- WELLS, R.; MEREDITH Jr, W.R. 1986. Okra leaf normal leaf yield interactions. II. Analysis of vegetative and reproductive growth. *Crop Sci* 26, 219–228.

Drenes subsuperficiales: control de la salinización edáfica en producciones intensivas bajo cubierta

CUELLAS, M.¹; ALCONADA MAGLIANO, A.^{2*}

RESUMEN

La actividad productiva del Cinturón Hortícola del Gran La Plata, con características comunes a todo el cinturón metropolitano, se desarrolla en suelos con restricciones de permeabilidad. El manejo productivo junto con el riego con agua de baja calidad y con las características de los suelos provoca degradaciones por salinización, alcalinización y anegamiento, favoreciendo la incidencia de plagas y enfermedades y afectando el desarrollo del cultivo. Se estudió la eficiencia de drenes subsuperficiales para controlar la salinización de un suelo Hapludert típico degradado con cultivos protegidos. Se compararon drenes con dos diámetros (10 y 15 cm) instalados sobre el techo del Bt, distanciados entre sí a 5 m, respecto a un tratamiento con yeso. Se siguió la evolución del suelo y cultivo en tres ciclos productivos. Los drenes disminuyeron marcadamente la salinidad sin diferencias atribuibles al diámetro. El yeso solo tuvo mejoras temporales. Se observó hacia el segundo y tercer ciclo productivo, el efecto de los drenes en todo el sitio, incluido el testigo (CE inicial promedio del sitio 4,5 dS.m⁻¹ vs. CE final 1,77 dS.m⁻¹). La alcalinización no se modificó con ningún tratamiento. El rendimiento del cultivo aumentó con el uso de drenes, cubriendo el costo adicional de instalación, y mejorando el resultado económico del sistema.

Palabras clave: suelo Hapludert, alcalinización, yeso.

ABSTRACT

The productive activity of the horticulture belt of Gran La Plata region, with common features throughout the metropolitan's belt, develops in soils with restricted permeability. The production management, along with irrigation using poor quality water and the characteristics of the soil, cause degradation by salinization, alkalization and waterlogging, favoring the incidence of pests and diseases and affecting crop development. The subsurface drainage efficiency was studied to control soil salinization of a Typic Hapludert soil degraded for protected crops. Drains of two diameters (10 and 15 cm) installed on the roof of Bt, spaced to 5 m, about gypsum application were compared. Soil evolution and cultivation was evaluated during three production cycles. Drains markedly decreased soil salinity, independently to the diameter of them. The use of gypsum only showed temporary improvements. It was noted to the second and third production cycle, the effect of the drains around the site, including the control (average initial site CE 4.5 dS.m⁻¹ vs 1.77 dS.m⁻¹ end CE). Alkalization was unchanged with any treatment. Crop yield increases with the use of drains, covering the additional cost of installation, and improving the economic performance of the system.

Keywords: Hapludert soil, alkalization, gypsum.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Área Metropolitana de Buenos Aires (EEA) (AMBA), Agencia de Extensión Rural (AER) La Plata. Ruta 36 Km 44,5 (1900 La Plata). Correo electrónico: cuellas.marisol@inta.gov.ar
²Edafología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Calle 60 y 119 s/n (1900), La Plata, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La importancia socioeconómica, productiva y ambiental de la horticultura intensiva es ampliamente conocida y analizada en diferentes ámbitos públicos y privados. Desde el punto de vista socioeconómico genera alrededor de dos millones de puestos de trabajo, y representa aproximadamente el 11% del PB agrícola nacional (Fernández Lozano, 2012). La producción se concentra en los denominados "Cinturones hortícolas" (ubicados alrededor de las grandes ciudades); el Metropolitano (CHM) es el de mayor importancia, debido a que provee de alimentos frescos aproximadamente a 13 millones de habitantes. Dentro del CHM, el área de mayor importancia es la del Gran La Plata, con una superficie cercana a las 4641 ha bajo cubierta (Miranda, 2017).

Las condiciones productivas de cultivo, suelo y agua de la región del Gran La Plata, así como sus consecuencias ambientales y socioeconómicas, en términos generales son comunes al resto de las áreas hortícolas que integran el CHM, e incluso semejante a otros cinturones hortícolas del país, donde el manejo determina en relación con los suelos, problemáticas vinculadas principalmente a su salinización y alcalinización. La magnitud de la ocurrencia de estos procesos degradativos resulta de las relaciones entre el tipo de suelo, manejo del cultivo (agroquímicos, enmiendas químicas y orgánicas) y manejo del agua de riego (calidad y cantidad).

Específicamente en la región de estudio (Gran La Plata), los suelos destinados a la producción hortícola son clasificados como *Hapludert típico* (Serie Gorina) y *Argiudol vértico* (Series Estancia Chica y Seguí) (Hurtado *et al.*, 2006). En su condición natural estos suelos presentan un fuerte desarrollo con un horizonte A bien provisto en materia orgánica (>5%) relacionado con un pH ligeramente ácido y a una adecuada provisión y proporción de cationes (principalmente Ca^{+2}). El nivel de Na^+ es muy bajo y el perfil se encuentra libre de sales. Como única limitante química se destaca el bajo contenido de fósforo (<10ppm BK1). La propiedad que condiciona el manejo de estos suelos es la permeabilidad moderadamente baja a baja y la elevada plasticidad debido al alto contenido de arcillas desde superficie que se incrementa en profundidad. Específicamente en el Vertisol (Hapludert típico) el contenido de arcillas en superficie es de aproximadamente un 30-40%, y en el horizonte Bt subyacente aumenta a un 50-65%. Se destaca una elevada proporción de esta arcilla, de tipo expansiva, que se manifiesta en grietas y abundantes slickensides. Estos suelos son regados con agua bicarbonatada sódica (la que prevalece en la región) (Alconada y Zembo, 2000) y son manejados intensivamente (laboreos, aplicación de agroquímicos, abonos orgánicos, fertilizantes, etc.) (Guiffre *et al.*, 2004). Consecuentemente, se favorece la ocurrencia de degradaciones edáficas (físicas, químicas y biológicas) de variada magnitud, pero asociadas en todos los casos a procesos de salinización y alcalinización (Alconada y Huergo, 1998; Alconada *et al.*, 2006; González y Amma, 1976; Poncetta *et al.*, 2006).

Alconada y Huergo (1998) y Alconada y Zembo (2000) encuentran vinculaciones entre la calidad del agua de riego, tipo de suelo, manejo, y rendimientos en sistemas de producción hortícola intensiva, con el nivel de salinización y alcalinización. Se indica para el horizonte A (0-20 cm) valores de hasta 7-8 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ de conductividad eléctrica (CE, salinización) y 9-10 de RAS (alcalinización), destacándose en los primeros 2 cm de suelo concentraciones de sales que conducen a valores de hasta más de 50 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ de CE, y 25 de RAS. Alconada *et al.*, (2011) señalan la asociación entre la salinización con la aplicación elevada de fertilizantes, sin un criterio ajustado a los requerimientos del cultivo y nutrición edáfica.

Como consecuencia de lo indicado, se restringe aún más la baja permeabilidad natural de los suelos, generando acumulaciones de agua en superficie (encharcamiento) y subsuperficialmente en el techo del horizonte Bt (pudiendo formarse un horizonte E). Asociado a esto, se observa una mayor incidencia de enfermedades, plagas, con drásticas disminuciones del rendimiento, y en casos extremos hasta abandono del sitio productivo (Alconada *et al.*, 2000b, Alconada, 2005). A fin de revertir la situación planteada, en la región de estudio se incrementa la aplicación de biocidas, abonos, fertilizantes, y consecuentemente los costos, sin lograr mejorar los rendimientos, por lo cual disminuyen los márgenes brutos (Alconada *et al.*, 2011). Asimismo, se registra una contaminación del agua subterránea, principalmente con nitratos (Auge y Nagy, 1999; Minghinelli, 1995) y de los productos de cosecha.

Resulta entonces necesario controlar el aporte de sales al suelo, y evitar su concentración, especialmente de las sales con Na^+ , manteniendo una adecuada permeabilidad en el área de influencia de las raíces, evitando su ascenso por capilaridad (Pla Sentís, 1983). Esto podría lograrse mediante la instalación de drenes en la parte superior del horizonte Bt, al disminuir el encharcamiento, la acumulación de sales e interrumpir el ascenso capilar. Otra técnica de efectividad probada en otros sistemas productivos y suelos es la aplicación de yeso que presenta resultados inciertos en la región e incluso contraproducentes en el objetivo buscado debido posiblemente a la dosis ensayada, drenaje altamente restringido y manejo implementado (Alconada *et al.*, 2000a). En general en la región se recomiendan dosis muy bajas e insuficientes (Balcaza, 2001b).

En el presente trabajo se tuvo como objetivo estudiar la evolución de las sales en un suelo *Hapludert típico*, con cultivo de pimiento (*Capsicum annum L.*) protegido con drenes subsuperficiales de dos diámetros, respecto a la aplicación de enmienda cálcica, estableciendo la factibilidad técnica, productiva y económica de dichas prácticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y características productivas

El estudio se realizó en un invernáculo (460 m^2), de un establecimiento productivo de la zona hortícola del Gran La Plata, provincia de Buenos Aires. Durante tres ciclos pro-

ductivos (2009-2011) de un cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.). El manejo implementado fue de tipo tradicional, conforme recomendaciones frecuentes para la región: densidad de plantación 20.000 plantas.ha⁻¹, fertirriego con riego por goteo (20 cm entre goteros) con dos mangueras de riego por lomo, lámina de riego promedio de 100-200 cc por día cada gotero. Fertilización por ciclo de cultivo: 360 kg.ha⁻¹ de nitrato de calcio, 540 kg.ha⁻¹ de nitrato de potasio y 240 l.ha⁻¹ de ácido fosfórico; y abonos orgánicos en general cama de pollo, en dosis variables entre 20 a 40 t.ha⁻¹.

Caracterización inicial del sitio

Descripción del suelo dentro del invernadero, según normas de reconocimiento de suelos de uso frecuente (Etcheverehere, 1976). Las propiedades analíticas se analizaron por procedimientos estándares (Page *et al.*, 1982) y el P asimilable por el método de Bray Kurtz 1, clasificando el suelo por Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 2006). La calidad del agua para riego fue evaluada en su composición química según procedimientos estándares (APHA, AWWA, WPCF, 1989), definido a través de los diagramas de Piper-Hill y evaluada en su aptitud para riego según los criterios de Ayres y Wescott (1987).

Ensayos

Se compararon los siguientes tratamientos: T1 dren corrugado de PVC de 10 cm de diámetro, T2 dren corrugado de PVC de 15 cm de diámetro y T3 enmienda cálcica (yeso), respecto a un testigo (T4).

Tratamientos con drenes

Se instalaron los drenes en una zanja de 0,4 m de ancho realizada sobre el techo del horizonte Bt, de 30 m de longitud y con pendiente del 0,3%. La profundidad a la cual quedaron instalados los drenes para esta pendiente fue de 0,50 m y 0,59 m para un extremo y otro de dichos drenes. La distancia entre tratamientos (T1 y T2) fue de 5 m, debido a que en trabajos previos se obtuvo que distanciamiento de 3 m resultaba muy próximo (Alconada *et al.*, 2000a). Los drenes presentaban orificios de 3-4 mm distribuidos en forma helicoidal, por lo cual, para evitar su taponamiento se cubrieron con material filtrante de piedra granítica de 1-2 cm de diámetro, en un espesor de 5 cm en todo el perímetro. Una vez instalados los drenes, se cubrió con tierra del horizonte A, desechando la parte extraída del horizonte Bt.

Tratamiento con yeso

Se aplicó yeso en el ciclo del año 2009 y se repitió en el año 2011. Se distribuyó al voleo, y se incorporó mediante una rotativa. La dosis aplicada fue de 6,7 t.ha⁻¹, y se calculó sobre la base de Na⁺ intercambiable para reemplazar (aproximadamente 3 cmolc.kg⁻¹) (Cadahia, 1998).

Luego de instalados los tratamientos, se prepararon los lomos de plantación conforme se realiza en los sistemas productivos de la región para el cultivo de pimiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue un arreglo factorial, completamente al azar con 6 repeticiones, en donde los factores fueron dos: años y tratamientos. Se analizaron los resultados por ANVA según diseño el experimental indicado, con Prueba de F test unilateral (P 0,05 y 0,01), comparación de tratamientos por test de Duncan, y correlación de tipo lineal entre variables químicas mediante el programa InfoStat (Infostat, 2004).

Evolución de las variables edáficas

Se efectuó un total de 12 muestreos, en todos los casos las muestras de suelo fueron tomadas a 0-20 cm y 20-40 cm de profundidad.

Muestreo inicial previo a los tratamientos

F0 (diciembre 2008). Muestreo compuesto en cada uno de los sectores en los que se instalaron los tratamientos y el testigo.

Muestreos durante el desarrollo del cultivo

Luego de instalados los tratamientos, se efectúan 4 muestreos: antes de implantación del cultivo (AI), en estado vegetativo (EV), reproductivo (ER), y al final del ciclo (FC). Esto se realizó durante los tres ciclos del cultivo estudiado, resultando las siguientes fechas de muestreo: F1 (marzo 2009, EV), F2 (junio 2009, ER), F3 (agosto 2009, FC), F4 (enero 2010, AI), F5 (marzo 2010, EV), F6 (junio 2010, ER), F7 (agosto 2010, FC), F8 (enero 2011, AI), F9 (marzo 2011, EV), F10 (junio 2011, ER), F11 (agosto 2011, FC). Las muestras correspondientes al desarrollo del cultivo, EV y ER, se tomaron por repetición (6 submuestras) en los tratamientos y el testigo. En los muestreos realizados al inicio (AI) y al final (FC) del ciclo del cultivo se tomó una muestra compuesta de cada tratamiento y del testigo.

Determinaciones efectuadas

Sobre todas las muestras de suelo extraídas en los tres ciclos de cultivo (total 480 muestras) se midió pH en pasta y en el extracto a saturación, la conductividad eléctrica (CE) y cationes solubles, calculando con estos la relación de adsorción sodio (RAS), según procedimientos estándares de evaluación (Page *et al.*, 1982).

Estudios en el cultivo

Se midió al inicio de cada uno de los ciclos, en etapa vegetativa (F1, F5 y F9) las siguientes variables: altura de planta, calibre del tallo, estimación del área foliar y número de frutos por planta. Estas fueron evaluadas sobre 6 plantas de cada repetición correspondientes a los tratamientos y al testigo. Al finalizar el periodo productivo (F3, F7 y F11) se midió: peso fresco de las plantas y rendimiento del cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Suelo inicial

El suelo descrito en el sitio de trabajo (dentro del invernáculo) se lo clasificó como Hapludert típico. Presentó un horizonte A de 20 cm de espesor y 30% de arcilla, inmediatamente debajo se observó un Bt con alto contenido de arcillas (47,7%), donde la proporción de tipo expansiva resulta suficiente como para generar slickensides. Se midió en superficie una elevada salinidad, alcalinidad, pH y P asimilable: pH 8,3, CE 4,5 dS.m⁻¹, RAS 20,3, PSI 23,3 y P 131 ppm, que revela un proceso manifiesto de degradación, coincidente con lo indicado para la región en estos esquemas productivos por el uso excesivo de agroquímicos, abonos, manejo del suelo y agua de riego (Alconada *et al.*, 20011; Guiffre *et al.*, 2004). Este suelo dista marcadamente de la condición natural descrita por Hurtado *et al.* (2006) donde, como se comentó, presenta como limitantes un drenaje imperfecto y bajo contenido de P, pero sin sales ni álcali, bajo pH y una elevada fertilidad química.

Agua de riego

Se caracterizó como de tipo bicarbonatada sódica (HCO₃⁻ 7,8 me.l⁻¹, Na⁺ 7,3 me.l⁻¹), con bajo contenido de Ca²⁺ (1,1 me.l⁻¹) y Mg²⁺ (0,7 me.l⁻¹), pH 7,7, de relativamente baja salinidad (CE 820 uS.m⁻¹) y alta alcalinidad (RAS 7,7). Esto define un agua de riesgo de ligero a moderado por la CE y la RAS (Ayers y Wescott, 1987).

Evolución de la salinidad, conductividad eléctrica

Primer ciclo de cultivo

En la tabla 1 se presentan los valores de conductividad eléctrica (CE, dS.m⁻¹) a 0-20 cm y 20-40 cm de profundidad en los cuatro sitios, en las 12 fechas muestreadas (enero 2009-agosto 2011). En superficie (0-20 cm), en F0 (previo a la instalación del ensayo) se parte, al igual que lo indicado precedentemente al caracterizar el tipo de suelo, de una elevada salinidad (CE) con variaciones importantes según sector (entre 3,1 a 5,9 dS.m⁻¹, sitio de T4 y T2 respectivamente). Los niveles de salinidad y variabilidad aquí obtenidos fueron del mismo orden que los reportados en la región en suelos con cultivos protegidos (Alconada y Huergo, 1998) y pueden explicarse por las relaciones que resultan entre el tipo de suelo, su manejo, calidad del agua de riego y aplicación de fertilizantes (Alconada y Zembo, 2000). En todos los casos, la salinidad obtenida superó el nivel óptimo de 2,2 dS.m⁻¹ para máximos rendimientos y calidad del cultivo de pimiento (Nuez *et al.*, 1996). En la tabla 1 se aprecian las fechas donde se produjeron diferencias significativas, destacándose durante el desarrollo del cultivo (F1 y F2), entre los tratamientos y el testigo (T4). Así, en F1 (EV) la salinidad para los T1 y T2 disminuyó marcadamente respecto del testigo, el cual aumentó significativamente (P<0,01) respecto de F0 (de 3,1 a 9,8 dS.m⁻¹). En el estado reproductivo (F2), si bien esta diferencia entre tratamientos y testigo continúa siendo significativa,

fue menos acentuada. El tratamiento con yeso (T3) presentó un comportamiento respecto de T4 semejante a los T1 y T2 (drenes).

Sin embargo, se aprecia una diferencia para destacar en el comportamiento entre fechas del T3 respecto a los tratamientos con drenes. Durante F1 y F2, en T1 y T2 disminuye significativamente (P<0,05) la concentración salina respecto de F0 (A1), mientras que en T3 (yeso) no varió entre fechas. En el testigo (T4) también se producen diferencias entre fechas, pero aumentando significativamente (P<0,01) llegando hasta duplicarse respecto a F0. Esto último es lo que normalmente se reporta para condiciones de manejo tradicional en la región de estudio, donde se producen picos salinos asociados principalmente a las dosis de fertilización, al momento fenológico del cultivo y a la estación climática (Alconada *et al.*, 2004a; 2004b). Al final del primer ciclo estudiado (F3 FC) todos los tratamientos disminuyeron la salinidad significativamente (P<0,05) respecto del inicio del ensayo (F0) y por el contrario el testigo (T4) se mantuvo en el mismo orden de valores.

Subsuperficialmente (20-40 cm) (tabla 1), al igual que en superficie, hubo al inicio (F0) una alta variabilidad entre sitios, siendo también la CE mayor en el sitio donde luego se instaló el T2. En F1 (EV) en todos los sitios, aumentó significativamente (P<0,05) la CE. Hacia F2 (ER) y F3 (FC) la salinidad disminuyó significativamente para los tratamientos, y por el contrario el testigo (T4) mantuvo la concentración salina elevada, diferenciándose así significativamente (P<0,05) de los tratamientos.

Segundo ciclo de cultivo

Tal como se observa en la tabla 1, no hubo diferencias significativas en ninguna situación ni profundidad. Se aprecia una disminución de la salinidad en todas las fechas respecto al año anterior (2009) para igual sitio. Así por ejemplo, se destaca que en superficie en F5 (EV) la CE varió entre 2,4 y 3,9 dS.m⁻¹ y en F6 (ER) entre 2,3 y 3,3 dS.m⁻¹. Subsuperficialmente la CE para todas las fechas y sitios fue como máximo de 2,2 dS.m⁻¹ (tabla 1), no produciéndose en ningún caso los típicos picos salinos que se mencionaron precedentemente como habituales en la región de estudio (Alconada *et al.*, 2004a, 2004b). Puede indicarse entonces que la instalación de los drenes tuvo un efecto en todo el sitio de estudio provocando un descenso generalizado de la salinidad, esto coincide con lo señalado en otro estudio con drenes instalados a 3 m entre sí (Alconada *et al.*, 2000a). No obstante, los niveles de salinidad en superficie se mantuvieron superiores a lo indicado como óptimo para el cultivo de pimiento (Nuez *et al.*, 1996).

Tercer ciclo de cultivo

En superficie (tabla 1) se produjo nuevamente una elevación de la salinidad en F8 (A1), aunque menos acentuada que en el primer año de estudio, destacándose que además aumentó en el tratamiento con yeso (T3). Hacia F9

(EV) desaparecen las diferencias significativas y al final del ciclo (F11) se presentaron nuevamente diferencia entre sitios, siendo las concentraciones menores en los tratamientos con drenes (promedios 1,5 y 1,4 dS.m⁻¹), si bien en T3 y T4 se mantuvo también en valores relativamente bajos de CE (promedio 2,2 dS.m⁻¹). A mayor profundidad (20-40 cm) no hubo diferencias significativas entre sitios en ninguna de las fechas, manteniéndose en concentraciones bajas no superiores a 2,6 dS.m⁻¹, valor que se presentó en el testigo (tabla 1). Se aprecia nuevamente la tendencia del ciclo anterior, donde el efecto de los drenes se manifestó en todo el sitio de estudio, y en ningún caso se llegan a extremos salinos como los que fueron descriptos en el 2009 y los que se observan en forma habitual en la región de estudio.

Evolución de la Sodicidad (RAS) en suelos

En la tabla 2 se presentan los valores de RAS a 0-20 cm y 20-40 cm, respectivamente, para todos los sitios y periodo evaluado (2009-2011). Al igual que la CE, se inició el ensayo con una mayor alcalinidad donde se instaló el T2, asimismo se presentó una situación de alta variabilidad (coeficiente de variabilidad, CV en tabla 2) en todo el sector de estudio que continuó en las fechas siguientes (F0 a F3). Se destaca que los niveles de RAS observados fueron similares a los valores medidos en la región (Alconada y Huergo, 1998).

En F1 (EV) hubo diferencia entre los tratamientos (P<0,05), siendo menor la RAS en el T1. En la fecha

siguiente F2 (ER) el T1 continúa siendo menor, pero incluyéndose también al otro tratamiento con drenes T2, ambos se diferencian del testigo (P<0,05), el tratamiento con yeso no se diferenció de los tratamientos con drenes ni del testigo. Subsuperficialmente (tabla 2) en ambas fechas, el T2 se diferenció significativamente (P<0,05) del resto de los sitios. En fecha siguiente F3 solo en superficie se presentó diferencia significativa entre los tratamientos con drenes, T1 menor y T2 mayor valor. Durante el 2010 y 2011 para las dos profundidades estudiadas, no hubo diferencia significativa entre sitios, destacándose que, si bien disminuyó respecto al inicio del ensayo en todos los sitios, se mantuvo en valores elevados próximos a 19 (tabla 2).

Se aprecia entonces que los drenes no condujeron a una disminución significativa de la alcalinidad. Lo obtenido puede ser atribuido a la elevada RAS del agua de riego y a volúmenes de agua insuficientes que se aplican en el riego por goteo como para permitir la liberación del Na⁺ del suelo, el cual, además, es adicionado permanentemente con el riego. El agua de riego con elevado contenido de bicarbonatos y Na⁺ y bajo de Ca²⁺ y Mg²⁺ genera un empobrecimiento paulatino de dichos cationes en el suelo y un enriquecimiento de Na⁺, por precipitación como carbonato de calcio (CaCO₃) y carbonato de magnesio (MgCO₃) edáfico, conduciendo a su alcalinización (RAS) (Pla Sentís, 1983).

CE dS.m ⁻¹										
	T1	T2	T3	T4	cv	T1	T2	T3	T4	cv
	Superficial				2009		Subsuperficial			
F0	4,6 a	5,9 a	4,1 a	3,1 a		1,9 b	3,5 ab	2,1 ab	1,8 a	
F1	2,7 bA	4,0 bAB	4,4 aB	9,8 bC	24	2,6 cA	4,3 bB	2,5 bA	4,5 bB	40
F2	3,1 bA	3,1 bA	3,8 aA	7,5 bB	42	1,2 aA	1,2 cA	1,6 aA	3,1 abB	57
F3	2,2 cA	3,2 bAB	2,1 bA	4,1 aB	35	2,0 bA	2,5 dA	1,8 abA	3,5 abB	32
cv	31	15	15	30		18	19	33	52	
	Superficial				2010		Subsuperficial			
F4	2,5	2,5	2,5	3,1		1,9	2,1	2,4	3,0	
F5	3,4 aA	2,4 aA	3,6 aA	3,9 aA	63	1,0 aA	1,2 aA	1,7 aA	2,1 aA	64
F6	2,8 aA	2,5 aA	2,3 aA	3,3 aA	35	1,4 aA	2,2 aA	1,6 aA	1,8 aA	49
F7	1,2	1,2	1,6	1,6		0,9	1,0	1,0	1,2	
cv	51	36	58	51		36	46	51	72	
	Superficial				2011		Subsuperficial			
F8	2,7	1,7	3,6	3,9		1,7	1,6	2,1	2,6	
F9	1,5 aA	1,4 aA	1,5 aA	1,6 aA	30	1,3 aA	1,6 aA	1,3 aA	1,4 aA	28
F10	1,2 bAB	2,2 bAB	2,5 bB	1,6 aA	24	1,9 bA	1,7 aA	1,9 bA	1,5 aA	23
F11	1,5 a	1,4 a	2,0 ab	2,2 b		1,0 c	0,8 b	0,8 c	1,3 a	
cv	14	14	25	25		17	30	25	20	

Tabla 1. Evolución de la conductividad eléctrica (dS.m⁻¹), a dos profundidades de muestreo: superficial (0-20 cm) y subsuperficial (20-40 cm), entre enero 2009 y agosto de 2011 para los tratamientos y el testigo.

RAS										
T1	T2	T3	T4	cv	T1	T2	T3	T4	cv	
Superficial					Subsuperficial					
2009										
F0	13,0 a	31,6 a	18,9 a	24,7 a		15,7 a	20,6 a	19,2 a	21,0 a	
F1	12,8 aA	16,1 bcB	16,4 aB	13,7 bAB	15	12,4 bA	19,0 abB	13,7 bA	13,0 bA	19
F2	12,3 aA	14,3 cA	17,4 aAB	21,4 aB	25	12,0 bA	18,0 abB	14,0 bA	13,7 bA	15
F3	14,1 aA	19,8 bB	16,1 aAB	15,4 bAB	25	12,3 bA	15,5 bA	12,8 bA	15,4 bA	19
cv	19	16	15	18		13	15	14	12	
Superficial					Subsuperficial					
2010										
F4	17,5	12,4	15,6	12,6		14,0	14,6	16,0	15,3	
F5	14,0 aA	13,7 aA	15,0 aA	14,0 aA	43	10,7 aA	14,4 aA	13,1 aA	13,5 aA	55
F6	16,3 aA	19,6 aA	18,4 aA	19,4 bA	16	16,0 aA	19,7 aA	15,7 aA	21,0 aA	29
F7	13,0	9,4	13,6	10,8		9,6	9,6	10,3	10,1	
cv	34	38	26	17		46	28	52	38	
Superficial					Subsuperficial					
2011										
F8	14,4	15,7	10,7	13,7		12,3	13,6	12,0	12,0	
F9	14,2 aA	14,7 aA	14,6 aA	16,2 aA	27	15,0 aA	13,8 aA	12,7 aA	15,6 aA	18
F10	17,1 bA	16,8 abA	18,5 aA	15,7 aA	25	14,9 aA	14,1 aA	16,6 bA	12,7 aA	25
F11	16,3 b	18,7 b	19,6 a	17,2 a		11,2 b	14,0 a	13,5 a	13,9 a	
cv	8	13	35	28		18	15	13	18	

Tabla 2. Valores de RAS superficiales (0-20 cm) y subsuperficiales, entre enero 2009 y agosto de 2011 para los tratamientos y el testigo.

Reacción del suelo, pH

En la tabla 3 se presentan los valores de pH para todos los sitios y fechas de estudio (enero 2009-agosto 2011), en las dos profundidades de muestreo (0-20 cm y 20-40 cm). Se observa un comportamiento similar en todos los ciclos evaluados. Así, en ambas profundidades, al inicio de cada ciclo previo a la implantación del cultivo (F0, F4, F8 AI), el pH reveló una alcalinidad generalizada con extremos de 7,5 y 8,6. Durante el desarrollo del cultivo (EV y ER) en los tres ciclos, el pH disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a valores próximos a 7, atribuible al consumo de nutrientes y fertilización de carácter ácida. Al final de los tres ciclos (F3, F7 y F11 FC) el pH se eleva a valores próximos al inicio. Cabe destacar, que aunque hubo en algunas fechas diferencias estadísticas entre sitios, agrónomicamente no tendrían un efecto diferencial en el cultivo. Por consiguiente, si bien la aplicación de los fertilizantes incide en el descenso del pH, no se alcanzan valores considerados óptimos (pH 5,5 a 6,5) para el crecimiento del cultivo (Nuez *et al.*, 1996), por lo cual puede indicarse que el agregado de ácido fosfórico, tal como se recomienda en la región con la finalidad de disminuir el pH (Balcaza, 2001a), no provoca un efecto mejorador del pH que se mantenga en el tiempo y por el contrario, genera un efecto negativo por la acumulación excesiva de P (>150 ppm, con extremos de hasta 300 ppm) conducente a desequilibrios nutricionales y contaminación (Cadahia, 1998). Esto se corresponde con lo reportado en otros sitios del mundo

(INPOFOS, 2004) y específicamente en la región de estudio (Alconada *et al.*, 1999; 2004a; 2004b).

Evaluación fenológica y rendimiento

Evaluación fenológica

En la tabla 4 se presentan los valores correspondientes a la fenología (altura de planta, calibre del tallo y estimación del área foliar), peso fresco y rendimiento del cultivo, en los tres ciclos evaluados (2009-2011). Las diferencias entre tratamientos y el testigo (T4) se registraron desde el primer año en que se inició el ensayo. Así en el 2009, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) con un mejor desarrollo fenológico de los tratamientos respecto al testigo en todas las variables analizadas. Dentro de los tratamientos, se destaca el T1 que se diferenció significativamente ($P < 0,05$) del T2 y T3. El peor estado fenológico del testigo (T4) se correlacionó con la salinidad del suelo ($r > 0,75$ $P < 0,05$), la cual como se indicó presentó picos salinos de hasta 9,8 dS.m⁻¹ (tabla 1). Estos resultados se corresponden con los de Goykovic Cortés y Saavedra del Real (2007) para el cultivo de tomate, donde la salinidad afectó el número de hojas, el área foliar y la altura de la planta. Marschner (1995) atribuye este tipo de efectos sobre la vegetación a la presencia elevada de Na⁺ en el suelo por inducir a deficiencias de otros cationes como del K⁺ y asociado a esto, a alteraciones en el funcionamiento de las células estomática, con disminución de la fijación neta de

pH										
	T1	T2	T3	T4	cv	T1	T2	T3	T4	cv
Superficial					2009	Subsuperficial				
F0	7,50 a	7,90 a	8,10 a	8,06 a		8,20 a	8,60 a	8,60 a	8,80 a	
F1	7,02 bA	7,10 bA	7,17 bA	7,49 bB	2,04	7,04 bA	7,26 bAB	7,27 bAB	7,34 bB	3,0
F2	7,14 bA	7,32 cA	7,34 bcA	7,30 bA	2,75	7,28 cA	7,26 bA	7,42 bA	7,24 bA	3,5
F3	7,04 bA	7,36 cAB	7,43 cB	7,41 bB	3,72	7,21 bcAB	7,47 cB	7,06 bA	7,41 bAB	3,0
cv	3,2	2,0	2,2	2,5		1,9	1,65	3,3	2,6	
Superficial					2010	Subsuperficial				
F4	7,75	8,19	8,17	7,83		7,68	8,08	8,00	7,79	
F5	7,36 aA	7,33 aA	7,35 aA	7,42 aA	2,03	7,37 aA	7,37 aA	7,29 aA	7,39 aA	2,5
F6	7,46 aA	7,48 aA	7,63 bA	7,61 aA	1,32	7,03 aA	7,40 aA	7,10 aA	7,14 aA	4,0
F7	8,37	8,53	8,54	8,54		8,16	8,16	8,09	8,41	
cv	1,5	1,7	1,4	2,6		3,6	2,8	3,6	3,5	
Superficial					2011	Subsuperficial				
F8	8,47	8,77	8,41	8,56		8,50	8,58	8,42	8,57	
F9	7,51 aA	7,59 aA	7,61 aA	7,62 aA	2,30	7,30 aA	7,59 aBC	7,42 aAB	7,69 aC	1,9
F10	7,55 aA	7,66 aA	7,54 aA	7,70 aA	2,40	7,68 bA	7,64 aA	7,70 bA	7,66 aA	2,3
F11	8,17 b	8,80 b	8,50 b	8,57 b		8,05 b	8,63 b	8,50 c	8,78 b	
cv	2,1	2,2	2,2	2,3		1,6	1,5	2,0	2,0	

Tabla 3. Valores de pH superficiales (0-20 cm) y subsuperficiales (20-40 cm), entre enero 2009 y agosto de 2011 para los tratamientos y el testigo.

	HP(cm)	CT (cm)	AF (cm ²)	PF (g)	Rend. (t.ha ⁻¹)	
2009						
T1	122,5	A	0,6	A	135,6	A
T2	114,8	B	0,5	B	118,0	B
T3	113,1	B	0,5	B	113,1	B
T4	99,5	C	0,5	C	97,7	C
2010						
T1	145,1	C	0,5	B	79,3	B
T2	134,6	BC	0,4	B	72,5	AB
T3	128,2	AB	0,4	A	71,5	AB
T4	116,1	A	0,3	A	61,0	A
2011						
T1	100,8	BC	0,5	A	137,3	C
T2	110,5	C	0,5	A	126,5	BC
T3	90,0	A	0,5	B	113,6	AB
T4	97,6	AB	0,4	B	100,8	A

Tabla 4. Valores de fenología (altura de planta, calibre de tallo y estimación del área foliar), peso fresco y rendimiento del cultivo, en los tres ciclos evaluados (2009-2011) para los tratamientos y el testigo.

CO₂ por unidad de área, menor fotosíntesis y crecimiento de la planta. Nuez *et al.* (1996) también mencionan alteraciones en las funciones metabólicas del cultivo por me-

nor absorción de agua debida a la salinidad, con menor producción de biomasa fresca. En el presente estudio se registró un menor peso fresco de las plantas en el testigo

(T4) y el tratamiento con yeso (T3), que se diferencian significativamente ($P < 0,05$) de los dos tratamientos con drenes (tabla 4).

En el ciclo siguiente (2010) las diferencias a favor de los drenes respecto al testigo ($P < 0,05$) se mantuvieron, destacándose la mayor altura de planta, el calibre de tallo. El tratamiento (T3) con yeso no se diferenció del testigo y solo en calibre de tallo se diferenció de los drenes. Respecto al PF (peso fresco) el T2 resultó significativamente mayor ($P < 0,05$) que el resto de los tratamientos y el testigo (tabla 4). Igualmente, en el tercer año de estudio (2011), los drenes continuaron presentando un mejor desarrollo fenológico y un mayor peso fresco (PF). Se destaca que el T3 (yeso) en ningún caso se diferenció del testigo.

Rendimiento

En el primer año (2009) de instalado el ensayo, los rendimientos del cultivo fueron mayores en los tratamientos con drenes, diferenciándose significativamente ($P < 0,05$) del tratamiento con yeso (T3) y del testigo (T4) (tabla 4). En los tratamientos con drenes los rendimientos fueron superiores a $100 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ mientras que en el T3 y el T4 fueron relativamente bajos para estos suelos y sistema productivo (T3, $76 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ y T4, $62 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$). En los dos ciclos siguientes, los tratamientos no difieren entre sí en sus rendimientos, y si bien se diferencian del testigo ($P < 0,05$), en este último aumenta dicho rendimiento respecto al inicio del estudio.

Se aprecia entonces que la mejora en la salinidad comentada, atribuible a la instalación de los drenes en un distanciamiento próximo como para afectar más allá del sector tratado, se produjo en todo el sitio y condujo a un aumento general del rendimiento incluso del testigo (62 a $102 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) (tabla 4). Consecuentemente, el aumento de producción obtenido ya en el primer año resultó suficiente como para cubrir los costos de instalación de drenes.

CONCLUSIONES

El uso de drenes en el techo del horizonte Bt condujo a una disminución de la salinidad, aumento del rendimiento del cultivo de pimiento protegido, con independencia del diámetro del dren utilizado.

El tratamiento con yeso presentó un comportamiento variable que en ocasiones se asemejó a lo observado en drenes y en otras, al testigo.

El efecto de drenes se manifestó incluso en el testigo, hacia el final del ensayo se produjo una mejora general de la salinidad.

En otras variables, pH, RAS, no hubo mejoras en ningún caso, se mantuvo en un mismo orden de valores asociado a la calidad del agua de riego.

BIBLIOGRAFÍA

ALCONADA, M.; HUERGO, L. 1998. Degradación de suelos con cultivos protegidos: Tomate. Influencia de la calidad de agua

de riego. I Reunión de Producción Vegetal, NOA, Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

ALCONADA, M.; GIUFFRÉ, L.; HUERGO, L.; PASCALE, C. 1999. Suelos hiperfertilizados con fósforo. Cultivo de tomate en invernáculos. Actas XIV Congreso Latinoamericano de C. Suelo, Chile.

ALCONADA, M.; ZEMBO, J. 2000. Influencia cualitativa del riego con aguas subterráneas en suelos con producciones intensivas a campo y en invernáculo. 1.º Joint World Congresson Groundwater. Brasil.

ALCONADA, M.; RONCO, M.; BIONDINI, L.; BELTRANO, J. 2000a. Recuperación de suelos vérticos salinizados-alcalinizados con cultivos protegidos mediante drenes y enmiendas cálcicas. XXIII Congreso Argentino. X Congreso Latinoamericano de Horticultura.

ALCONADA, M.; WISNER, V.; MÓRTOLA, N.; ZEMBO, J.; GAMBOA, S.; QUINTEROS, C. 2000b. Chemical alternatives to the use of methyl bromide. I. Influence on edaphic salinity in tomato crops. En: ZEMBO, J.C. (coord.). Alternatives to Methyl Bromide in Strawberries, Tomato and Cut Flowers. Final Report Project Editorial Grafica Sur Editora SRL. 44–46 pp.

ALCONADA, M.; GIUFFRÉ, L.; PONCETTA, P.; BARRAGÁN, S.; INDA, E. CUELLAS, M. 2004a. Fósforo en suelo, su efecto en la productividad del cultivo de tomate protegido. II Simposio Nacional sobre suelos vertisólicos. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Paraná, Argentina.

ALCONADA, M.; MITIDIERI, A.; BARRAGÁN, S.; PONCETTA, P.; INDA, E. CUELLAS, M. 2004b. Tomate protegido: efecto de la nutrición nitrogenada sobre el suelo y el rendimiento. XVI Congreso Latinoamericano. XII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Cartagena de India, Colombia.

ALCONADA, M. 2005. Desinfección del suelo con vapor. Efectos sobre la nutrición de los cultivos. Ediciones INTA. 124 p.

ALCONADA, M.; PONCETTA, P.; CUELLAS, M.; BARRAGÁN, S.; INDA, E.; MITIDIERI, A. 2006. La fertirrigación en cultivo de tomate protegido (*Lycopersicon esculentum*): consecuencias ambientales, productivas y económicas. XX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. I Reunión de Suelos de la región Andina. Salta, Argentina.

ALCONADA, M.; CUELLAS, M.; PONCETTA, P.; BARRAGÁN, S.; INDA, E.; MITIDIERI, A. 2011. Fertirrigación en un cultivo de tomate protegido: I-Nutrición nitrogenada. Efectos en el suelo y en la producción. Revista Horticultura Argentina. Vol 30 N.º 72.

APHA; AWWA; WPCF. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. Vol. 17. Washington, DC.

AUGE, M.; NAGY, M. 1999. Estado del agua subterránea respecto a la contaminación con agroquímicos en La Plata, prov. de Buenos Aires. Hidrología Subterránea. Serie Correlación Geológica. V. 13: 203–211 pp.

AYERS, R.S.; WESCOTT, D.W. 1987. La calidad del agua en la agricultura. FAO Riego y Drenaje 29. 174 p.

BALCAZA, L. 2001a. Utilización de ácidos en fertirriego. Boletín Hortícola, F.C.A, UNLP-INTA, Gran Bs. As. N.º 26:13–15.

BALCAZA, L. 2001b. Aplicación de yeso en suelos de invernáculo cultivados con hortalizas. Boletín Hortícola. F.C.A, UNLP-INTA, Gran Bs As. Año 9. N.º 30: 4–6 pp.

CADAHIA LÓPEZ, C. 1998. Fertirrigación. Cultivos hortícolas y ornamentales. Ed. Mundi Prensa. 475 p.

ETCHEVEHERE, P.H. 1976. Normas de Reconocimiento de Suelos. Publicación N.º 152. INTA Castelar. 222 p.

FERNÁNDEZ LOZANO, J. 2012. La producción de hortalizas en Argentina. Gerencia de Calidad y Tecnología. Mercado Central de Bs. As. 29 p.

- GIUFFRÉ, L.; ALCONADA, M.; PASCALE, C.; RATTO, S. 2004. Environmental impact of phosphorus overfertilization in tomato greenhouse production. *Journal Applied Horticulture* V6 (1):58–61 pp.
- GONZÁLEZ, J.; AMMA, A. 1976. Manejo de suelos para producción de hortalizas. EEA INTA San Pedro. Tirada interna hortícola N.º 10 y 11.
- GOYKOVIC CORTÉS, V.; SAAVEDRA DEL REAL, G. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA Chile*. Vol. 25, N.º 3; 47–58 pp.
- HURTADO, M.; GIMÉNEZ, J.; CABRAL, M. 2006. Análisis Ambiental del partido de La Plata. Aportes al Ordenamiento territorial. Ed.1.ª Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires. 134 p.
- INFOSTAT. 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera edición, versión 2004, Editorial Brujas Argentina. 318 p.
- INPOFOS. 2004. El fósforo y el potasio en los sistemas de fertilización. La calidad del agua para riego en los sistemas de goteo. México & Northern Central America. Potash & Phosphate Institute. (Disponible: <http://www.ppi-far.org/ppiweb/mexnca.ns/> verificado: agosto de 2015).
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2.ª Edición. Academic Press, San Diego. 889 p.
- MINGHINELLI, F. 1995. Geohidrología ambiental del acuífero freático en las Cuencas de los arroyos Martín y Carnaval, La Plata. Evaluación impacto ambiental. CIC. 193 p.
- MIRANDA, M. 2017. Riesgos ambientales al cultivo bajo cubierta en el cinturón hortícola del gran La Plata. iii Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, Santa Fe, Argentina. Del 31 de julio al 3 de agosto.
- NUEZ, F.; ORTEGA, G. COSTA, J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ed. Mundi prensa. 607 p. PAGE, A.; A.H. MILLER y D.R. KEENEY. 1982. *Methods of Soils Analysis*. AMER. Soc. Agron. Soil Sci. Soc. AMER, Madison, Wisconsin.
- PLA SENTÍS, I. 1983. Sistema integrado agua-cultivo-suelo. Manejo para evaluar la calidad de agua de riego. International Atomic Energy Agency. Vienna: 192–206 p.
- PLA SENTÍS, I. 1993. Soil Salinization and Land Desertification. College on Soil Physics. International Centre for Theoretical Physics. Trieste, Italia. 35 p.
- PONCETTA, P.; ALCONADA, M.; LAVADO, R. 2006. Producción de tomate protegido en suelos decapitados con diferentes planes de fertilización. xx Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. I Reunión de Suelos de la región Andina. Salta, Argentina. Trabajo N.º 481. 6 p.
- SOIL SURVEY STAFF. 2006. Claves para la Taxonomía de suelos. USDA, Departamento de Agricultura USA. Traducción 2007. Ortiz, C.; Gutiérrez, M.C. 331 p.

Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis bovina en bovinos reactivos positivos a la prueba tuberculínica

GARBACCIO, S.G.¹; DELGADO, F.O.¹; ZUMARRAGA, M.J.²; RODRIGUEZ, L.R.³; HUERTAS, P.S.¹; GARRO, C.J.¹

RESUMEN

Mycobacterium bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB), enfermedad zoonótica que afecta la producción láctea y cárnica. En nuestro país, el diagnóstico se realiza a través de la prueba tuberculínica o intradermorreacción aplicándose en el pliegue anocaudal (PAC). Como complemento a la PAC se pueden llevar adelante estudios bacteriológicos a partir de diversas muestras biológicas como secreción nasal, leche y tejidos. A su vez, se puede observar el desarrollo de lesiones y su ubicación anatómica, además de coleccionar muestras para ser analizadas a través de bacteriología e histopatología. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *M. bovis* en muestras de secreciones nasales, leche y tejidos pertenecientes a bovinos PAC-positivos y caracterizar lesiones macro y microscópicas compatibles con la TBB. Fueron procesadas 744 muestras pertenecientes a 572 bovinos, provenientes de 24 rodeos lecheros de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Todos ellos se encontraban, durante este estudio, en etapa de saneamiento presentando una baja prevalencia (entre 0,5 y 4%). Se aisló *M. bovis* en 12,4% (71/572) de los bovinos examinados. Dicho agente provino de muestras de tejidos 36,5% (38/104), seguido de leche 10,7% (23/214) y, por último, desecreciones nasales 3,9% (10/254). Por un lado, el estudio bacteriológico a partir de las muestras de leche y secreciones nasales presentó una limitada efectividad. Por otro lado, el análisis de tejidos resultó de mayor utilidad como diagnóstico complementario, permitiendo confirmar los casos sospechados de TBB.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, bacteriología, tejidos, bovinos.

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is the causative agent of bovine tuberculosis (BTB), considered a zoonotic disease. In our country, the diagnosis is based on the application of the tuberculin skin test (TST). Conventional culture, from various biological samples, can complement the TST test results. Regarding this, it is possible to perform sampling and subsequent analysis of nasal discharge, milk and tissues. The latter allows the observation of macroscopic lesions, the anatomical location in addition to collect biological samples to be analyzed by bacteriology and histopathology. The aim of this study was to evaluate the presence of *M. bovis* in samples of nasal secretions, milk and tissues in cattle PAC-positive and characterize gross and microscopic lesions compatible with BTB. A total of 744 samples belonging to 572 cattle from dairy herds in the provinces of Córdoba, Santa Fe and Buenos Aires, were processed. All of them were, during this study, in stage of control of BTB showing a low prevalence (between 0.5 to 4%). About 12.4% (71/572) *M. bovis* isolations from cattle examined

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Hurlingham. Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: garbaccio.sergio@inta.gob.ar

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Hurlingham. Buenos Aires, Argentina

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Recursos Biológicos, Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN), Hurlingham. Buenos Aires, Argentina.

was obtained. These isolations were from tissue samples 36.5% (38/104), followed by milk 10.7% (23/214) and nasal secretions 3.9% (10/254). Bacteriology from milk samples and nasal secretions were of limited effectiveness. On the other hand, tissue analysis was more useful as complementary diagnostic, allowing confirmation of suspected cases of BTB.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, bacteriology, tissues, cattle.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB), cuyo agente etiológico es *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad infecciosa de carácter zoonótico que ocasiona serios problemas productivos, económicos y en la salud pública (Grange *et al.*, 2001). Se considera que 500 millones de bovinos estarían infectados con *Mycobacterium bovis* en el mundo, ocasionando una pérdida económica estimada en USD 3 billones (Hewinson *et al.*, 2001). En este sentido, un estudio realizado en Irlanda (Boland *et al.*, 2010) adjudica un 10% de disminución en la producción anual de leche en bovinos positivos a la intradermorreacción a diferencia de aquellos no infectados.

El programa de control y erradicación de TBB en Argentina se basa en la identificación y eliminación de animales infectados mediante la aplicación intradérmica de la prueba anocaudal (PAC) (Secretaría de Agricultura, 2012). Además, se establece el monitoreo y la vigilancia epidemiológica en frigoríficos donde los animales son inspeccionados con el fin de hallar lesiones compatibles con TBB (LCT).

La PAC ocupa un lugar protagónico en el diagnóstico, es la prueba de referencia a nivel mundial, utilizada ampliamente como prueba tamiz para el diagnóstico *in vivo* de la enfermedad. De acuerdo a la normativa vigente (Secretaría de Agricultura, 2012), un establecimiento ganadero lechero debe demostrar la ausencia de reactores en todos los bovinos mayores de 3 meses, durante dos PAC consecutivas para ser certificado como "Establecimiento Libre de TBB".

Diversos estudios otorgan a la PAC distintos valores de efectividad, oscilando en un rango del 70% al 90% y del 75% al 99,8% para sensibilidad y especificidad respectivamente (Costello *et al.*, 1997; De Kantor *et al.*, 1984; Francis, 1978).

Estos valores se encuentran relacionados con la prevalencia de cada predio ya puede influir directamente en el valor predictivo del ensayo diagnóstico.

La posibilidad de un resultado falso positivo en un animal infectado puede deberse principalmente a reacciones inespecíficas ocasionadas por otras micobacterias patógenas (*M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) y ambientales (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2002).

La observación de LCT puede resultar un buen complemento diagnóstico, mientras que la utilización de métodos diagnósticos tales como bacteriología e histopatología permite generar información adicional a la PAC con el fin de comprender de manera detallada la situación sanitaria de animales sospechados de TBB. En este sentido diversos estudios demostraron el uso diagnóstico de la bacteriología a partir de secreciones nasales (De Souza Figueiredo *et al.*,

2010; Neill *et al.*, 1998), de leche (Pérez *et al.*; 2002; Zarden *et al.*, 2013) y de tejidos (Liébana *et al.*, 1995; Whipple *et al.*, 1996), por lo que se la consideró como técnica de referencia en el diagnóstico confirmatorio de TBB.

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar *M. bovis* a partir de secreción nasal, de leche y de tejidos provenientes de bovinos positivos a la PAC, describiendo además la presentación de lesiones compatibles con TBB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional transversal entre enero de 2005 y enero de 2012. Se seleccionaron 572 bovinos de raza Holando-Argentino provenientes de 24 rodeos lecheros de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Dichos rodeos, presentaron una prevalencia aparente que osciló entre 0,5 y 4%; encontrándose en etapa de saneamiento durante este trabajo. Todos los bovinos incorporados a este estudio resultaron positivos a la PAC, llevada a cabo según la normativa vigente (Secretaría de Agricultura 1999 y 2012). Las muestras biológicas recolectadas fueron las siguientes:

Ante mortem

Secreción nasal

Se recolectaron muestras de secreción nasal utilizando hisopos estériles, previa sujeción del animal en cepo. Se obtuvieron dos muestras por animal introduciendo el hisopo en cada ollar al menos 3 veces con movimientos ascendentes y descendentes. Las muestras fueron conservadas a 4 °C y luego decontaminadas utilizando el método de Petroff (Jorge *et al.*, 2005). Posteriormente fueron sembradas por duplicado en los medios Stonebrink y Löwenstein Jensen e incubadas a 37 °C durante dos meses. Los desarrollos micobacterianos obtenidos fueron observados en microscopio (baciloscopía), previa tinción de Ziehl Neelsen (ZN) a fin de evidenciar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Leche

Se higienizó y desinfectó la glándula mamaria según los procedimientos previstos en la rutina de ordeño descrito en la "Guía de Buenas Prácticas en explotaciones lecheras" (FAO, 2012). Tras la eliminación de las primeras secreciones de cada cuarto mamario, se recolectaron por duplicado muestras conformadas por los cuatro cuartos mamaros de cada animal (50 ml cada uno). Las muestras fueron refrige-

radas a 4 °C y luego procesadas con la misma metodología descripta para la muestra de secreción nasal.

Post mortem

Tejidos

Los bovinos positivos a la PAC fueron sometidos a necropsia o inspección detallada en frigorífico, observando y describiendo presencia de lesiones compatibles con TBB. Posteriormente se recolectaron muestras por duplicado, tuvieran o no LCT. Una de ellas fue conservada a 4 °C y la otra fijada en solución tamponada de formaldehído al 10% para la realización de estudios bacteriológico e histopatológico respectivamente.

Bacteriología

Las muestras recolectadas fueron agrupadas en tres conjuntos denominándolas de la siguiente manera: cabeza (CAB), conformado por ganglios linfáticos (GI) retrofaríngeos y submandibulares; respiratorio (RES): ganglios traqueobronquiales, mediastínicos y pulmón; y finalmente digestivo (DIG): GI mesentéricos, hepáticos e hígado. Los tejidos fueron refrigerados y luego homogeneizados mecánicamente durante 3 min. (Masticator Basic IUL Instruments modelo N.º 470) para luego continuar con la decontaminación (método de Petroff) y siembra de igual manera a lo descripto para las muestras anteriores. Aquellos bovinos que presentaron más de un aislamiento de BAAR en diferentes órganos fueron considerados como único resultado.

Caracterización patológica

Se revisaron los órganos previamente descriptos considerando LCT a toda área de necrosis de color blanco-amarillento (focal o multifocal), con o sin mineralización, encapsulada o no por tejido conectivo (Neill *et al.*, 1988). Las muestras fijadas en solución de formaldehído al 10% fueron procesadas para estudio microscópico siguiendo procedimientos de rutina, hasta obtener secciones de 3 µm de espesor, las cuales se colorearon con hematoxilina y eosina. Se consideró compatible con la infección por *M. bovis* a todo aquel acúmulo de macrófagos epitelioides acompañado de linfocitos pudiendo o no presentar un centro de necrosis y mineralización, células gigantes de tipo Langhans, y tejido conectivo limitando la lesión. En aquellos órganos con LCT se realizó la coloración de ZN sobre cortes de tejido a fin de identificar BAAR.

Identificación de micobacterias

Los crecimientos obtenidos en los medios de cultivos en los cuales se detectaron BAAR fueron identificados a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como blanco la secuencia de inserción (IS) 6110 (propia del complejo *Mycobacterium tuberculosis*) (Hermans *et al.*, 1990). Los aislamientos positivos fueron genotipificados

por Spoligotyping, según lo descripto por Kamerbeek *et al.* (1997). Fueron considerados aislamientos positivos al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* aquellos PCR (IS) 6110 positivos, mientras que fueron considerados *M. bovis*, los positivos a PCR (IS) 6110 seguidos de Spoligotyping. Los aislamientos negativos a PCR fueron analizados por PCR-hsp65 con el objetivo de identificar especies comprendidas dentro del género *Mycobacterium*, de acuerdo a lo descripto por Telenti *et al.* (1993).

La extracción de ADN a partir de colonias desarrolladas en los medios de cultivo se realizó por lisis térmica colocando estas en 250 µL de agua bidestilada estéril e incubándolas a 95 °C durante 45 min.

Las condiciones de amplificación para ambos casos se realizaron de acuerdo a lo descripto por Zumárraga *et al.* (2005).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1. A continuación se describen los hallazgos obtenidos a partir de cada muestra biológica analizada.

Aislamientos en secreción nasal

Se analizaron 254 muestras correspondientes a bovinos seleccionados, desarrollando BAAR en el 11,4% (29/254) de estos. De estos aislamientos 3,9% (10/29) fueron identificados como *M. bovis* mediante Spoligotyping. Los 19 aislamientos restantes fueron positivos a PCR-hsp65, considerándolos por tanto como *Mycobacterium spp.*

Aislamiento en leche

Se analizaron 214 muestras correspondientes a bovinos seleccionados, obteniéndose aislamiento en 17% (37/214) de las muestras. De ellos, el 62% (23/37) fueron identificados como *M. bovis*. El 38% (14/37) restante correspondieron a especies del género *Mycobacterium spp.* tras haber resultado positivo a PCR-hsp65.

Muestreo	Tipo de muestra	N.º de animales analizados	Aislamientos <i>M. bovis</i> (%)
Ante mortem	Secreción nasal	254	10 (3,9)
	Leche	214	23 (10,7)
Post mortem	Tejidos	104	38 (36,5)
Total		572	71

Tabla 1. Resumen de los aislamientos obtenidos a partir de las distintas muestras analizadas.

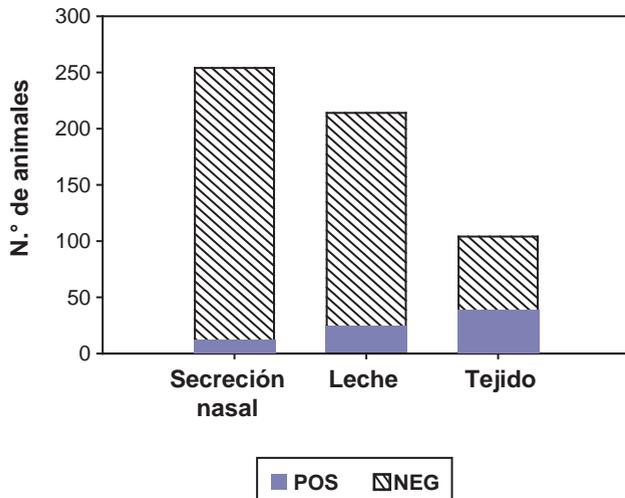


Figura 1. Números de aislamientos de *M. bovis* obtenidos según el tipo de muestra analizada.

Aislamientos en tejidos

Bacteriología

Fueron analizadas 276 muestras provenientes de necropsias o frigoríficos, de 104 bovinos PAC positivos. Se obtuvo un 36,5% (38/104) de aislamientos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, tal como se muestra en la figura 1. En el 76% (29/38) de estos fue confirmado la presencia de *M. bovis*, no pudiéndose realizar en el 24% (9/38) restantes. El 42% (16/38) de estos aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de RES el 21% (8/38) en muestras de CAB y el 18,5% (7/38) de DIG respectivamente. Se obtuvieron 18,5% (7/38) aislamientos en dos tejidos diferentes pertenecientes al mismo animal: 4 de ellos fueron en CAB y RES; 2 en CAB y DIG y el restante en RES y DIG. En ningún bovino se logró obtener aislamiento a partir de los tres grupos de tejidos muestreados.

De los aislamientos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el 79% (30/38) provino de bovinos con LCT mientras que un 8% (3/38) correspondieron a aislamientos obtenidos de bovinos que no presentaron LCT. El 13% (5/38) restante no fue inspeccionado *post mortem*.

Descripción de los hallazgos patológicos

Fueron inspeccionados el 84% (87/104) de los bovinos en estudio, encontrándose en el 56% (49/87) LCT. En el 61% (30/49) se aisló *M. bovis*.

De aquellos animales con LCT se observó en el 78% (38/49) la presencia de una sola lesión, mientras que el 16% (8/49) presentó 2 lesiones y en el 6% (3/49) de los casos hubo 3 o más lesiones.

La histopatología se realizó sobre 43 bovinos seleccionados, de los cuales el 56% (24/43) presentó LCT. Por una

parte, en 9% (4/43) de ellos no se habían encontrado lesiones macroscópicas durante la inspección. Por otra parte, en el 87,5% (21/24) de los animales con lesiones microscópicas se aisló *M. bovis*.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de secreción nasal sugieren que el aislamiento del agente en dicha muestra es de baja sensibilidad para detectar *M. bovis* en bovinos positivos a la PAC. En este trabajo se obtuvieron valores inferiores a los hallados en otros estudios, en los cuales las proporciones de aislamientos de *M. bovis* en bovinos naturalmente infectados fueron superiores a la aquí descrita (3,9%), variando entre 6,7% y 20% de los bovinos estudiados respectivamente (Neil *et al.*, 1988; Rempt, 1954). Estas diferencias podrían adjudicarse a factores tales como la eliminación intermitente de micobacterias (De Souza Fregueiredo *et al.*, 2010), la presencia de micobacterias no viables en el material colectado, o que la metodología de descontaminación utilizada afecte la sobrevivencia de las micobacterias (Cousins *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 2013). Otro factor para considerar es la posible presencia de bovinos falso positivos a la PAC dentro del grupo en estudio, sumado a que no todos pudieron ser inspeccionados *post mortem*. Debe considerarse además el límite de detección propio del ensayo bacteriológico para el cual se requieren valores superiores a 10 o 100 microorganismos viables para lograr un resultado positivo. Esta cantidad de microorganismos se asocia generalmente a una etapa avanzada de la enfermedad por lo que en ciertos estadios de esta no serían detectables (Barry *et al.*, 1993; Bates *et al.*, 1986). En este sentido, fue descrito a partir de infecciones experimentales un incremento en los niveles de eliminación por esta vía durante las primeras 4 semanas posinfección, decreciendo posteriormente (Kao *et al.*, 2007). Así mismo fue descrito que durante la infección pueden suceder períodos prolongados en los cuales no se logra aislar el microorganismo a partir de secreción nasal (Kao *et al.*, 2007; McCorry *et al.*, 2005; Neill *et al.*, 1998).

En el caso de las muestras de leche, los aislamientos obtenidos en este trabajo (10,7%) han sido superiores a resultados previamente descritos por Pérez *et al.* (2002); quienes detectaron *M. bovis* en el 0,7% de las muestras de bovinos PAC positivos, utilizando metodología similar. Por su parte, Romero *et al.* (1999) no obtuvieron aislamientos tras analizar 200 muestras de leche provenientes de bovinos PAC positivos. Estas diferencias podrían relacionarse con aspectos similares a aquellos anteriormente mencionados para secreción nasal.

Desde el punto de vista de la salud pública estos hallazgos refuerzan la necesidad de asegurar el tratamiento térmico de la leche destinada a consumo (pasteurización). Asimismo, desde el aspecto sanitario-productivo, debe considerarse que aquellos bovinos eliminadores por esta vía pueden facilitar la transmisión de la enfermedad a sus crías o a un grupo de terneros que bajo sistemas de crianza artificial son alimentados con leche cruda (Evangelista *et al.*, 1996; Garro *et al.*, 2011; Garro *et al.*, 2011).

La proporción de aislamientos obtenida en tejidos (36,5%) fue inferior a aquella descrita en Brasil (51,5%) (Cardoso *et al.*, 2009) y en Gran Bretaña (50%) (Liébana *et al.*, 1995), pero mayor a lo reportado en Etiopía (11%) (Berg *et al.*, 2009). Esta diferencia podría relacionarse con algunas de las variables previamente mencionadas, tales como el tipo y cantidad de muestras recolectadas por animal en estudio, la metodología de descontaminación aplicada en cada caso, como así también el bajo número de micobacterias viables que puede presentarse en un tejido con LCT (Araujo *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2002). Cabe remarcar además que los bovinos analizados provinieron de establecimientos en saneamiento y con baja prevalencia. Si bien la PAC es considerada una técnica específica, su valor predictivo positivo disminuiría, incrementando por ende la probabilidad de que algunos de los animales incluidos en este estudio hayan sido falsos positivos. Este aspecto pudo afectar directamente la eficiencia en el aislamiento de *M. bovis* a partir de las distintas muestras analizadas (secreción nasal, leche y tejidos).

La observación de presencia o ausencia de lesiones macroscópicas es útil para el diagnóstico en frigoríficos o durante la necropsia. De acuerdo a los resultados obtenidos, resulta mayor la probabilidad de hallar LCT al realizar una meticulosa revisión *post mortem*. En frigoríficos comerciales el tiempo destinado para la inspección y toma de muestras es limitado y tal vez la presencia de una sola lesión no llegue a evidenciarse. La proporción de aislamiento de *M. bovis* a partir de LCT fue del 61%. En este sentido, en un ensayo realizado entre 4 laboratorios de Argentina para establecer el porcentaje de recuperación por cultivo de *M. bovis* a partir de muestras de tejidos con LCT se obtuvieron valores similares a los presentados en este trabajo (Garbaccio *et al.*, 2016).

Los aislamientos obtenidos a partir de muestras de tejidos (36,5%) fueron superiores a aquellos logrados en muestras de secreción nasal (3,9%) y de leche (10,7%). Dicha diferencia puede atribuirse a que el microorganismo en el hospedador establece una forma de vida intracelular, siendo esta la forma en la que se encuentran en los tejidos blancos. Por ello, este tipo de muestra cobra mayor relevancia al momento de pretender un aislamiento de *M. bovis*.

En concordancia con lo descrito por Whipple *et al.* (1996), la mayoría de los aislamientos fueron obtenidos de órganos respiratorios (42%), seguidos por las muestras pertenecientes a CAB (21%), resultando los aislamientos de DIG los menos frecuentes (18,5%). Estos resultados indican que al igual que lo descrito en otros trabajos, la vía de transmisión más importante en bovinos adultos es la respiratoria (Goodchild *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1995; Pritchard, 1988).

A diferencia de lo ocurrido con las muestras de secreción nasal y de leche, no se obtuvieron aislamientos de *Mycobacterium spp.* en muestras de tejidos. Estos hallazgos se podrían relacionar con que micobacterias consideradas atípicas pueden encontrarse normalmente en el medioambiente (Oriani *et al.*, 2002), posibilitando su presencia en

vías aéreas y glándula mamaria, y por ende en la muestra de secreciones nasales y de leche respectivamente.

Por una parte, con respecto a los hallazgos de LCT, la mayoría de los bovinos (78%) presentaron una sola lesión; valor superior al 66% descrito por Corner (1994) y Corner *et al.* (2012). Esta información indicaría la necesidad de realizar una inspección minuciosa de los tejidos durante la faena o la necropsia para evitar la posible liberación a consumo de material contaminado.

Por otra parte, el 8% de los aislamientos obtenidos de tejidos provino de bovinos que no presentaron LCT durante la inspección *post mortem*. En este sentido, Whipple *et al.* (1996) describieron una proporción aún mayor (10%) de aislamientos logrados a partir de tejidos que no presentaron LCT. Resultados similares se obtuvieron tras el estudio histopatológico ya que 9,3% de los casos considerados positivos a este ensayo, no habían presentado lesiones visibles macroscópicamente.

De acuerdo a lo descrito en distintos trabajos (Garbaccio *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2008), la incorporación de PCR directa de tejido resultaría complementaria a la metodología aquí realizada (inspección de lesiones, bacteriología e histopatología); mejorando la sensibilidad como así también disminuyendo el tiempo de laboreo requerido para la bacteriología (2 días versus 60 días).

Los resultados presentados en este trabajo indican la importancia del diagnóstico bacteriológico a partir de las distintas muestras analizadas. El aislamiento de *M. bovis* a partir de leche y secreción nasal tendrían limitada utilidad diagnóstica, aunque son muestras de fácil obtención, a partir del animal en pie. Por el contrario, el análisis bacteriológico de tejidos sería de mayor relevancia diagnóstica tal como fue descrito por Mantilla *et al.* (2009). Su utilización permitiría comprender eventos sanitarios que requieran de un análisis detallado, como sería el caso de un predio libre de TBB donde se presentan nuevos reactores a la PAC o aquellos con un bajo número de reactores, sospechados de posibles resultados falsos positivos a la PAC. De esta manera, el cultivo seguido de la tipificación molecular permite avanzar en la resolución de situaciones específicas, brindando además información complementaria acerca de las cepas circulantes en un predio o región y su potencial uso desde el punto de vista epidemiológico.

La implementación efectiva de las distintas técnicas diagnósticas disponibles debería ser tenida en cuenta para su uso estratégico en función de los programas provinciales o nacionales de control y erradicación de la tuberculosis bovina.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAÚJO, C.P.; LEITE, C.Q.; PRINCE, K.A.; DOS SANTOS GONÇALVES JORGE, K.; ALVES ROSA OSORIO, A.L. 2005. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 100, N.º 7, 749–752.
- BARRY, T.; GLENON, M.; SMITH, T.; GANNON, F. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. Vet. Rec. 132: 66–67.

- BATES, J.; BRENNAN, P.; DOUGLAS, W.G.; FEELY, J.C. 1986. Improvements in the diagnosis of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis*. 134: 415–417.
- BERG, S.; FIRDESSA, R.; HABTAMU, M.; GADISA, E.; MENGISTU, A.; YAMUAH, L.; AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ROBERTSON, B.D.; SMITH, N.H.; ENGERS, H.; YOUNG, D.; HEWINSON, G.R.; ASEFFA, A.; GORDON, S.V. 2009. The Burden of Mycobacterial Disease in Ethiopian Cattle: Implications for Public Health. *PLoS One*. 4(4): e5068.
- BOLAND, F.; KELLY, G.E.; GOOD, M.; MORE, S.J. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*. 93,153–161.
- CARDOSO, M.A.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; LEITE, C.Q.F.; SANTOS, A.C.B.; SIQUEIRA, V.L.D.; OKANO, W.; ROCHA, N.S.; LONARDONI, M.V.C. 2009. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56, 465–470.
- CORNER, L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, 156(1-2):162–71.
- CORNER, L.A.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D.U. 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet. Microbiol*. 156(1-2):162–71.
- COSTELLO, E.; EGAN, J.W.; QUIGLEY, F.C.; O'REILLY, P.F. 1997. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet. Rec*, 141(9):89–95.
- COUSINS, D.V.; WILTON, S.D.; FRANCIS, B.R.; GOW, B.L. 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 30(1):255–258.
- DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci*. 81 (2), 190–210.
- DE KANTOR, J.N.; ODEÓN, A.C.; STEFFAN, P.E.; AUZA, M.J.; MADRID, C.R.; MARCHEVSKY, N. 1984. Sensitivity of the cervical and the caudal fold tuberculin tests with *M. bovis* in infected cattle of Argentina. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz*. 3 (1), 137–142.
- DE SOUZA FIGUEIREDO, E.E.; CARVALHO, R.C.; SILVESTRE, F.G.; LILENBAUM, W.; FONSECA, L.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M. 2010. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. *Braz. J Microbiol*, 41(2):386–90.
- EVANGELISTA, T.B.R.; DE ANDA, J.H. 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium spp.* exposure associated with management of colostrum and milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 27, 23–27.
- FAO PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL. 2012. Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. (Disponible: <http://www.fao.org/3/a-ba0027s.pdf> verificado 23 de septiembre de 2016).
- FRANCIS, J. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec*. 103:420–425.
- GARBACCIO, S.G.; CATALDI, A.A. 2010. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Argent Microbiol*. 42(4):247–53.
- GARBACCIO, S.; BARANDIARAN, S.; FERNANDEZ, A.; MACIAS, A.; MAGNANO, G.; MARTINEZ VIVOT, M.; PEYRÚ, M.; CATALDI, A. 2016. Interlaboratory test: Isolation of *Mycobacterium bovis* from granulomatous lesions in bovine. *Rev. Argent Microbiol*. 48 (2):161–5.
- GARRO, C.; COBOS ROLDÁN, M.; ORIANI, S.; GARBACCIO, S. 2011. Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo. *Rev. elect. vet. Volumen 12, N.º 12, 1–11.*
- GARRO, C.; MORRIS, W.; DELGADO, F.; GARBACCIO, S. 2011. Tuberculosis bovina en terneros. *Veterinaria Argentina*. Vol. xxviii. N.º 276, 1–10.
- GRANGE, J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*. 81(1/2): 71–77.
- GOODCHILD, A.V.; CLIFTON-HADLEY, R.S. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81, 23–41.
- HERMANS, P.W.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J.W.; SCHUIJTEMA, A.R.; MCADAM, R.A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J.D. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. Vol. 28 (9):2051–2058.
- HERWINSON, G. 2001. Introduction to *M. bovis* issue. *Tuberculosis*. 81(1-2): 3.
- JORGE, M.; ALITO, A.; BERNARDELLI, A.; CANAL, A.; CATALDI, A.; CICUTA, M.; GENTILE, F.; KISTERMAN, J.C.; MAGNANO, G.; MARTINEZ VIVOT, M.E.; ORIANI, D.S.; PAOLICCHI, F.; PEREZ, A.; ROMANO, M.I.; SCNEIDER, M.; TORRES, P.; ZUMARRAGA, M.J. 2005. Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en medicina veterinaria. Comisión Científica de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. 20–28.
- KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M. VAN EMBDEN, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*; 35:907–914.
- KAO, R.R.; GRAVENOR, M.B.; CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. 2007. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *J. R. Soc. Interface*. 4, 545–551.
- LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A.; VILAFRANCA, M.; GOMEZ-MAMPASO, E.; TERCERO, J.C.; ALEMANY, J.; SUAREZ, G.; DOMINGO, M.; DOMINGUEZ, L. 1995. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis Complex* Organisms in Bovine Tissues Sample by PCR. *J Clin Microbiol*. 35(1):33–36.
- MANTILLA, G.J.; ORTIZ, M.M.; ACOSTA, A.M.; ACOSTA, G.R.; SOUSA, Z.J. 2009. Diagnóstico de tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o histopatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina. *MV Rev. de Cien. Vet*. Vol. 25 N.º 1, 7–9.
- MCCORRY, T.; WHELAN, A.O.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J.; WALTON, E.; BRYSON, D.G.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M.; POLLOCK, J.M. 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet. Rec*. 157, 613–618.
- MILLER, J.M.; JENNY, A.L.; PAYEUR, J.B. 2002. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin fixed tissues from culture negative ruminants. *Vet. Microbiol*. 87, 15–23.
- MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol*. 40,153–177.

- NEILL, S.D.; HANNA, J.; O'BRIEN, J.J.; MCCRACKEN, R.M. 1998. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340–343.
- NEILL, S.D.; O'BRIEN, J.J.; MCCRACKEN, R.M. 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet. Rec.* 122: 184–186.
- O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease.* 76, Supplement 1, 1–46.
- ORIANI, D.S.; SAGARDOY, M.A. 2002. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev Argent Microbiol.*; 34 (3):132–7.
- PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; HERMOSO DE MENDOZA, J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* Vol.18; 127(3-4): 315–24.
- PÉREZ, A.; RENIERO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LÓPEZ, B.; RITACCO, V. 2002. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. *Rev Argent Microbiol.* 34(1):45–51.
- PRITCHARD, D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Review. J Comp Pathol.* 99 (4): 357–99.
- REMPT, D. 1954. *Veterinary work in the Netherlands 1953.* Netherland Veterinary Service. 80.
- ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. 1996. Identification of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Samples by PCR Species-Specific Primers. *Can J Vet Res.*63: 101–106.
- SENASA/SAGPyA, 1999. Secretaría de Agricultura, Dirección de Sanidad Animal, Argentina, "Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina," Resolución N.º 115/99.
- SENASA/SAGPyA, 2012. Secretaría de Agricultura, Dirección de Sanidad Animal, Argentina, "Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina," Resolución N.º 128/2012.
- STEWART, L.D.; MCNAIR, J.; MCCALLAN, L.; GORDON, A.; GRANT, I.R. 2013. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One.* 8(3):e58374.
- TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALTZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.C.; BODMER, T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 175–178.
- WHIPPLE, D.L.; BOLIN, C.A.; MILLER, J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 351–354.
- ZARDEN, C.F.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.; LILENBAUM, W. 2013. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. *Vet. Rec.*; 172 (5):130.
- ZUMÁRRAGA, M.J.; MEIKLE, V.; BERNARDELLI, A.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 232–238.

Essential oils from Argentinean native species reduce *in vitro* methane production

GARCIA, F.^{1,2}; BRUNETTI, M.A.³; LUCINI, E.I.²; SCORCIONE TURCATO, M.C.¹; MORENO, M.V.³; FROSSASCO, G.P.³; COLOMBATTO, D.^{1,4}; MARTÍNEZ, M.J.³; MARTÍNEZ FERRER, J.³

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de aceites esenciales (AE) de plantas nativas de Argentina en la producción de metano durante la fermentación *in vitro*, en comparación con AE con efectos comprobados como modificadores de la fermentación ruminal. Se realizó un diseño en bloque completos al azar y los AE y dosis evaluados fueron: *Aloysia gratissima* (0,5, 5, 50 y 250 mg/L), *Eucalyptus globulus* (5, 50, 150 y 300 mg/L), *Lippia turbinata* (30, 60, 120 y 240 mg/L), *Mentha x piperita* var. *vulgaris* (50, 100, 200 y 400 mg/L), *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* cv. Compacto (0,5, 5, 50 y 250 mg/L) y cv. Mendocino (50, 150, 250 y 350 mg/L), *Rosmarinus officinalis* (100, 300, 500 y 700 mg/L), *Schinus molle* (75, 150, 300 y 600 mg/L), *Tagetes minuta* (5, 50, 125 y 250 mg/L), y *Thymus vulgaris* (5, 50, 150 y 300 mg/L). Se incluyeron dos controles: control (sin AE) y monensina (1,87 mg/L). Las variables evaluadas fueron: digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro, producción de gas y metano. En comparación al control, la monensina redujo la producción de metano en un 44%, pero con una reducción de un 15% en la digestibilidad de la fibra. Con excepción a *E. globulus* y *L. turbinata*, todas las variables fueron reducidas significativamente con el mayor nivel de inclusión comparado con el control, lo cual representa que la actividad microbiana se vio afectada. *L. turbinata* (60,8% limoneno) redujo la producción de metano a la mitad comparado al control, y entre un 35 y 85% en comparación a la monensina, sin que la digestibilidad de la fibra se vea afectada. Algunos aceites esenciales de plantas nativas de Argentina demostraron gran potencial para reducir la producción de metano entérico sin afectar la digestibilidad, de los cuales *L. turbinata* fue la alternativa más promisoría.

Palabras clave: metano, aditivos naturales, compuestos secundarios de plantas, fermentación ruminal.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of Argentinean essential oils (EO) on methane production during *in vitro* fermentation compared to EO with proven effects as rumen fermentation modifiers. A complete randomized block design was used and the treatments included EO from *Aloysia gratissima* (50, 100, 150 and 300 mg/L), *Eucalyptus globulus* (5, 50, 150 and 300 mg/L), *Lippia turbinata* (30, 60, 120 and 240 mg/L), *Mentha x piperita* var. *vulgaris* (50, 100, 200 and 400 mg/L), *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* cv. Compacto (0.5, 5, 50 and 250 mg/L) and cv. Mendocino (50, 150, 250 and 350 mg/L), *Rosmarinus officinalis* (100, 300, 500 and 700 mg/L), *Schinus molle* (75, 150, 300 and 600 mg/L), *Tagetes minuta* (5, 50, 125 and 250 mg/L), and *Thymus vulgaris* (5, 50, 150 and 300 mg/L). Two controls were included: control (not containing EO) and monensin (1.87 mg/L). Variables measured were: digestibility of neutral detergent fiber, gas and methane production. Compared to the control, monensin reduced methane production by 44%, but with a 15% reduction in fiber digestibility. Except for *E. globulus* and *L. turbinata*, each variable measured was significantly reduced.

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. Correo electrónico: fgarcia@agro.unc.edu.ar

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Manfredi, Argentina.

⁴Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

ced with the higher level of inclusion compared to the control, representing that overall microbial activity was affected. *L. turbinata* (60.8% limonene) reduced methane by half compared to control, and by 35 to 85% when compared to monensin, without affecting digestibility of the fiber. Some essential oils from native Argentinean plants exhibited great potential to reduce enteric methane production without affecting digestibility, of which *L. turbinata* was the most promising alternative.

Keywords: methane; natural additive; plant secondary compound; rumen fermentation.

Abbreviations: ADF, acid detergent fiber; CP, crude protein; DM, dry matter; D-NDFom, digestibility of organic matter neutral detergent fiber; EO, essential oils; GHG, greenhouse gas; ivDMD, *in vitro* dry matter digestibility; NDF, neutral detergent fiber; NDFom, organic matter neutral detergent fiber; NDFom d, organic matter neutral detergent fiber digested; OM, organic matter.

INTRODUCTION

There are growing concerns over greenhouse gas (GHG) emissions due to their effects on global warming. In this regard, livestock emerges as one of the top two or three most significant contributors to climate change (Steinfeld et al., 2006), being responsible for up to 14.5% of anthropogenic GHG, where methane is the most emitted gas with about 44% of the sector's emissions.

Methane is an unavoidable by-product of anaerobic microbial fermentation of carbohydrates in the rumen carried out by the microorganisms which are in symbiosis with ruminants. In addition to the effects on the environment, it implies a loss of 2 to 12% of gross energy provided by the diet (Johnson and Johnson, 1995). Therefore, diminishing its production in the rumen is one of animal nutrition research interests.

By manipulating the rumen microbial ecosystem it is feasible to reduce methane production by selective inhibition of methanogenic microorganisms (Johnson and Johnson, 1995). Antibiotics (e.g., ionophores) have long been used in the area of nutritional interventions to favorably impact on rumen fermentation in order to reduce waste input to the environment and to improve the efficiency of feed nutrients used by animals. An increasing awareness of the hazards associated with chemical feed additives, i.e., the presence of chemical residues in animal-derived foods and development of bacterial resistance to antibiotics, resulted in their prohibition for other purposes not related to specific prevention and/or treatment of animal health and well-being in many European countries (Regulation 1831/2003/EC), being under revision in several other countries as well.

In the search of natural alternatives, essential oils (EO) have been tested for their antimicrobial activity and a considerable number of studies have shown their potential to beneficially modify rumen fermentation reducing methane production (Benchaar and Greathead, 2011; Cieslak et al., 2013; Khiaosa-ard and Zebeli, 2013). Essential oils are complex mixtures of volatile lipophilic secondary metabolites (Benchaar and Greathead, 2011) having great diversity in composition depending on geographic variations, genetic factors, physiological stage at harvest, plant growing condi-

tions, plant parts used and extraction methods (Calsamiglia et al., 2007; Figueiredo et al., 2008). The chemical composition of EO is one of the factors affecting their bioactivity in altering the rumen ecosystem, along with the dose and the base diet used (Khiaosa-ard and Zebeli, 2013; Klevenhusen et al., 2012; Lin et al., 2013).

Novel sources of EO, not yet explored in ruminant nutrition, may broaden the spectrum of what has already been studied. In this sense, different EO from native Argentinean plants have been reported for their bioactivity in a variety of biological processes (Fuselli et al., 2006; García et al., 2003; Tereschuk et al., 1997), representing a promising alternative to modify rumen fermentation. The aim of this study was to evaluate the effect of four Argentinean EO on methane production during *in vitro* fermentation, in comparison to EO with proven effects as rumen fermentation modifiers.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

A completely randomized block design was used, considering incubations as blocks (repetitions), thrice-repeated in three consecutive weeks. Within each block, treatments were in duplicate, considered as replicates. Four EO from native Argentinean plants were tested together with six non-native Argentinean plants, at four doses (Table 1).

Doses of EO were chosen based on the results of a preliminary study (García et al., 2014), where a broader range of doses were tested for all EO (1, 10, 100 and 100 mg/L DMi). The selection criterion to define doses was methane production inhibition without affecting overall digestion. Two controls were included: control (not containing EO) and monensin (Option 20%, Brascorp S.A., Buenos Aires, Argentina) at 1.87 mg pure monensin/L.

Essential oils

Native plants from Argentina: *Aloysia gratissima*, *Lippia turbinata* and *Tagetes minuta* were collected in Chara-

	mg/L			
	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4
Native Argentinean plants				
<i>Aloysia gratissima</i>	50	100	150	300
<i>Lippia turbinata</i>	30	60	120	240
<i>Schinus molle</i>	75	150	300	600
<i>Tagetes minuta</i>	5	50	125	250
Non- Argentinean plants				
<i>Eucalyptus globulus</i>	5	50	150	300
<i>Mentha x piperita</i> var. <i>vulgaris</i>	50	100	200	400
<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> cv. C.	0.5	5	50	250
<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> cv. M.	50	150	250	350
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	300	500	700
<i>Thymus vulgaris</i>	5	50	150	300

Table 1. Essential oils and doses evaluated.

cato, Córdoba (31°28'77" S, 64°12'32" W) and *Schinus molle* was provided by the Faculty of Agronomy of Córdoba University (31°44'06" S, 64°18'48" W). Exotic plants: *Eucalyptus globulus*, *Mentha x piperita* var. *vulgaris*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* cv. Compacto and cv. Mendocino, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* were obtained from commercial farms in Villa Dolores, Córdoba (31°56'67" S, 65°11'53" W) and from the Faculty of Agronomy of Córdoba University. Aerial parts of plants were harvested at full flowering, air dried, and oil was obtained by steam distillation using an all-glass Clevenger-type apparatus. Oils were dried over anhydrous sodium sulphate and stored at -20°C until further use and analyses. The EO composition was analyzed by gas chromatography coupled mass spectrometry (GC-MS). The analysis was carried out on a Perkin Elmer Clarus 600 GC-MS instrument equipped with two columns: Supelcowax 10 (30 m x 0.25 µm) and DB-5 fused silica column (30 m x 0.25 µm). The carrier gas was helium at an initial temperature of 60°C for three minutes and increased 4°C/min to 240°C.

In vitro incubation

Rumen fluid was collected on the day of the experiment in a pre-warmed thermo flask from three rumen-fistulated Hereford steers (516 ± 53 kg) before morning feeding, kept on a daily ration of alfalfa hay:corn grain diet (80:20 DM basis). Once in the laboratory, all manipulations were done under a constant stream of CO₂ gas. Rumen fluid was pooled and homogenized in a blender for one minute, strained through two layers of cheesecloth twice, and collected into a flask. It was constantly homogenized using a magnetic stirrer, held at 39°C in a water-bath under CO₂ stream until inoculation. The substrate used for incubation was a mixture of 0.4 g of alfalfa plus 0.1 g of corn grain, which were previously freeze-dried and milled through a 2

mm sieve. The chemical composition of the substrates is shown in Table 2.

Incubations were conducted in 100 mL serum bottles containing 40 mL of carbonate-phosphate buffer (Tilley and Terry, 1963) and 10 mL of strained rumen fluid. A stock solution of monensin and of each EO and dose was prepared in ethanol at the necessary concentration to achieve final doses in the bottle, and 200 µL of this solution were dispensed into the bottles immediately before inoculation with rumen fluid. An equivalent amount of ethanol was added to the control. Immediately after the rumen fluid was dispensed, the bottles were flushed with CO₂ gas, sealed with butyl rubber stoppers and aluminum crimp seals, and placed in a water-bath (39°C). A blank (rumen fluid plus buffer, without substrate) was included and data was used for correction. Head-space gas pressure was measured at predetermined points during incubation using a pressure transducer (Sper Scientific Ltd., Scottsdale, Arizona, USA). Bottles were manually shaken after each reading. During the rapid gas production phase, the bottles were sampled more frequently to prevent headspace pressure from reaching 7.0 psi, as suggested by Theodorou et al. (1994), and all accumulated gas was collected in 250 mL vials for methane determination. At each sampling point, headspace gas was collected from the bottles with a gastight syringe until readings reached equilibrium with the atmospheric pressure (0.00 psi). At the end of incubation (72 h) bottles were placed in ice to stop fermentation and stored at -20°C until further analyses.

Determination and chemical analysis

The substrate was analyzed for the following parameters: organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and *in vitro* dry matter digestibility (ivDMD). Organic matter was determined at 550°C for 6 h; CP was obtained by the Kjeldahl method (AOCS:

	OM	CP	NDF	ADF	ivDMD
Alfalfa	891	190	453	316	643
Corn	985	83	159	34	871

Table 2. Chemical composition (g/kg DM) of alfalfa hay and corn grain used as substrates for *in vitro* ruminal fermentation.

Notes: OM: Organic matter; CP: Crude protein; NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber; ivDMD: *In vitro* dry matter digestibility.

954.01, 1998); NDF and ADF analyses were performed according to Van Soest et al. (1991) using an ANKOM200 Fiber Analyzer (Ankom®, Tech. Co., Fairport, NY, USA); and ivDMD as proposed by Tilley and Terry (1963) using a DaisyII incubator (Ankom®, Tech. Co., Fairport, NY, USA).

A linear regression pressure-volume was used for regression-corrected gas-volume. Cumulative gas production was calculated by summing the regression-corrected gas volume for each measurement time and corrected by blank. Methane concentration was determined by gas chromatography using a Hewlett Packard 4890 instrument equipped with a Porapak N 80/100 analytical column (2 m) with nitrogen as the carrier gas. Injector temperature was 110°C, the column was held constantly at 90°C during analysis and the detector temperature (FID) was 250°C.

In vitro digestibility of ash free neutral detergent fiber (D-NDFom) was obtained according to Van Soest et al. (1991); briefly, the bottle content was transferred into 200 mL tubes and 100 mL neutral detergent solution plus heat stable α -amylase were added. After 1 h boiling, residues were filtered in preweighed glass crucibles (DURAN® 25-851-32 filter crucibles) and oven-dried at 105°C for 24 h. Dry residues were weighed and ashes determined at 550°C for 4 h. The same procedure was carried out with the substrate to determine ash free neutral detergent fiber (NDFom) incubated, and by the difference with the residues, to calculate the NDFom digested (NDFom d) after blank correction. The formula used for calculation of D-NDFom was: NDFom d/ NDFom incubated * 100.

Statistical analysis

All data were analyzed using InfoStat software (Di Rienzo et al., 2011). Data were analyzed by performing analysis of variance and treatment and blocks as a fixed effect: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$, where Y_{ij} was the observation, μ was the overall mean for each parameter, τ_i was the effect of treatment, β_j was the effect of block and ϵ_{ij} was the residual error. Differences between treatments were compared with the Fisher LSD test and significant differences were declared at $p < 0.05$.

RESULTS

The EO composition was largely variable, as shown in Table 3. The number of chemical components ranged from

five (e.g. *E. globulus*) to 40 (e.g. *O. vulgare*), showing great difference in the proportion represented by the first three main components: *A. gratissima* around 30%; *S. molle* 50%; *O. vulgare* ssp. *hirtum* cv. Mendocino, *R. officinalis*, *S. molle* and *T. vulgaris* about 60%; *L. turbinata*, *M. x piperita* var. *vulgaris*, *O. vulgare* ssp. *hirtum* cv. Compacto and *T. minuta* more than 70%; and over 90% for *E. globulus*.

The effects of EO on gas production, D-NDFom and methane are presented in Table 4. Gas production for control was 292.0 mL/g OMi, D-NDFom of 0.477 g/g and 24.6 mg/g OMi of methane production. Compared to the control, monensin reduced gas production by around 25% and 44% mg of methane per g OMi, but at the expense of a 15% reduction in D-NDFom.

All levels of *L. turbinata* and *R. officinalis* at the lower level (100 mg/L) reduced gas production (23 to 35%) with greater methane inhibition (65 to 92%) when compared to the control, interestingly with no effects on fiber digestibility. Intermediate to high doses of *R. officinalis* (300, 500 and 700 mg/L) also reduced gas and methane production (~35% and ~90% respectively); however, fiber digestibility was severely affected (more than 20%).

Compared to the control *A. gratissima* and *E. globulus* had no effects on the variables studied, except for *A. gratissima* at 300 mg/L that reduced fiber digestion by 14%. *S. molle* and *T. vulgaris* reduced gas production and D-NDFom at higher doses, though a decrease in methane was not attained.

Although evaluated at different dose ranges, both cultivars of *O. vulgare* ssp. *hirtum* at the highest level reduced gas production and D-NDFom. When compared at similar doses, increasing the dose from 50 to 250 mg/L had a greater effect in Compacto than in Mendocino in reducing gas and methane production and fiber digestion.

A reduction in gas (30 to 35%) and methane production (80 to 90%) was observed for the intermediate dose of *M. x piperita* var. *vulgaris* (200 mg/L) and intermediate to high doses of *T. minuta* (125 and 250 mg/L) compared to the control, with a reduction of around 15% in D-NDFom.

Reductions relative to control in methane production (mg/g NDFom d) and fiber digestibility are shown in Fig. 1. Almost one third of the additives tested reduced methane production by over 50%, most of which (8 out of 13) were associated with a concomitant reduction in fiber digestion (over 10%).

DISCUSSION

The effects of monensin on fermentation parameters *in vitro* are consistent with those reported elsewhere (Castillejos et al., 2006; Russell and Strobel, 1989; Wallace et al., 1981). Russel and Strobel (1989) reported an association with methane reduction to a decrease in acetate production caused by a reduction in the digestion of neutral detergent fiber.

Nº of compounds		Proportion of the three main components		
<i>A. gratissima</i>	21	Spathulenol 13.8%	Eucalyptol 12.8%	Caryophyllene oxide 8.5%
<i>E. globulus</i>	5	Eucalyptol 76.6%	Terpinyl acetate 8.0%	Terpinen-4-ol 6.2%
<i>L. turbinata</i>	12	Limonene 60.8%	Bornyl acetate 8.2%	Eucarvone 5.8%
<i>M. x piperita</i> var. <i>vulgaris</i>	14	Menthol 51.1%	Menthone 24.0%	Menthofurane 7.2%
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> cv. C.	40	Sabinene hydrate <i>trans</i> 33.0%	Thymol 26.6%	γ-Terpinene 12.4%
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> cv. M.	40	Sabinene hydrate <i>trans</i> 37.7%	Thymol 17.8%	γ-Terpinene 6.4%
<i>R. officinalis</i>	19	Eucalyptol 24.7%	β-Myrcene 20.5%	Camphor 14.2%
<i>S. molle</i>	21	Dehydroxy-isocalamendiol 18.9%	α-Phellandrene 14.4%	Limonene 13.8%
<i>T. minutus</i>	9	Verbenone 42.2%	Cis tagetone 27.9%	D-limonene 6.0%
<i>T. vulgaris</i>	18	Thymol 27.9%	p Cymene 22.5%	γ-Terpinene 16.2%

Table 3. Number of compounds detected (> 99%) and proportion of the main three compounds of the essential oils evaluated.

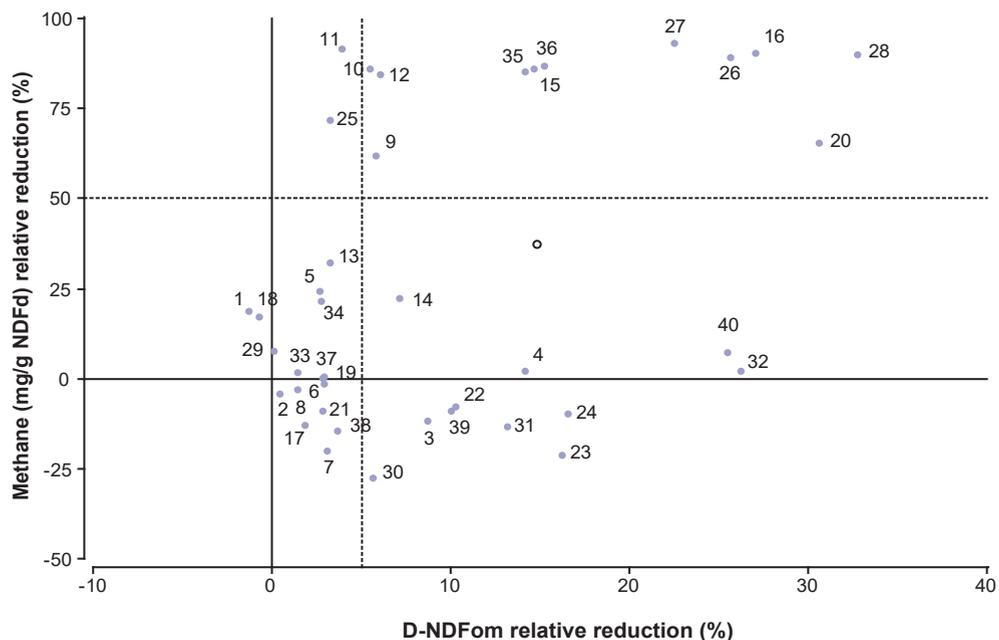


Figure 1. Reduction in methane production and fiber digestibility by EO (•) and monensin (o) relative to control. Notes: 1-4. *Aloysia gratissima* (50, 100, 150 and 300 mg/L); 2-8. *Eucalyptus globulus* (5, 50, 150 and 300 mg/L); 9-12. *Lippia turbinata* (30, 60, 120 and 240 mg/L); 13-16. *Mentha x piperita* var. *vulgaris* (50, 100, 200 and 400 mg/L); 17-20. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* cv. *Compacto* (0.5, 5, 50 and 250 mg/L); 21-24. *O. vulgare* ssp. *hirtum* cv. *Mendocino* (50, 150, 250 and 350 mg/L); 25-28. *Rosmarinus officinalis* (100, 300, 500 and 700 mg/L); 29-32. *Schinus molle* (75, 150, 300 and 600 mg/L); 33-36. *Tagetes minuta* (5, 50, 125 and 250 mg/L); 37-40. *Thymus vulgaris* (5, 50, 150 and 300 mg/L).

Treatments	Doses (mg/L)	Gas production		D-NDFom ¹			Methane			
		mL/g OMi		g/g		%	mg/g OMi		mg/g NDFom d ²	
Control		292,0	∞	0,477	∞	12,4	24,6	∞	114,7	
Monensin	1,87	220,3	†	0,406	†	9,0	13,7	†	72,1	
<i>Aloysia gratissima</i>	50	303,4	∞	0,481	∞	10,0	20,3		95,0	
	100	296,8	∞	0,473	∞	13,0	25,9	∞	124,3	
	150	301,1	∞	0,435		12,8	25,7	∞	129,0	∞
	300	275,8	∞	0,407	†	11,2	20,3		114,0	
<i>Eucalyptus globulus</i>	5	290,6	∞	0,462	∞	9,4	18,5		89,5	
	50	294,6	∞	0,461	∞	12,3	24,3	∞	120,6	
	150	295,9	∞	0,461	∞	13,2	27,5	∞	135,4	∞
	300	294,9	∞	0,468	∞	11,5	22,8		112,2	
<i>Lippia turbinata</i>	30	224,7	†	0,446		5,5	9,0	†	45,7	†
	60	207,3	†	0,449		2,9	4,2	†	11,0	†
	120	202,0	†	0,455	∞	1,5	2,0	†	9,6	†
	240	190,4	†	0,445		3,2	4,4	†	21,0	†
	50	253,2	†	0,459	∞	9,2	16,8		77,5	
<i>Mentha x piperita var. vulgaris</i>	100	242,5	†	0,441		8,4	18,5		92,8	
	200	193,7	†	0,395	†	2,0	2,7	†	18,1	†
	400	177,6	†	0,345	†	1,7	2,3	†	13,2	†
	0,5	295,1	∞	0,464	∞	13,0	25,9	∞	129,6	∞
<i>Origanum vulgare ssp. hirtum (Comp.)</i>	5	289,5	∞	0,480	∞	11,1	21,7		98,0	
	50	300,3	∞	0,461	∞	12,1	24,4	∞	118,6	
	250	198,0	†	0,330	†	3,3	4,5	†	38,0	†
	50	293,4	∞	0,462	∞	12,9	26,0	∞	125,0	∞
<i>Origanum vulgare ssp. hirtum (Mend.)</i>	150	299,9	∞	0,428	†	13,1	26,8	∞	128,9	∞
	250	283,5	∞	0,398	†	13,0	25,4	∞	145,0	∞
	350	260,7	†	0,395	†	12,7	22,6		128,2	∞
	100	219,9	†	0,460	∞	4,0	5,9	†	28,4	†
<i>Rosmarinus officinalis</i>	300	190,3	†	0,347	†	1,5	1,9	†	12,9	†
	500	188,7	†	0,367	†	1,0	1,2	†	7,9	†
	700	183,3	†	0,317	†	1,6	2,1	†	13,3	†
	75	304,6	∞	0,474	∞	12,1	24,0	∞	110,1	
<i>Schinus molle</i>	150	307,5	∞	0,448		15,0	30,8	∞	153,1	∞
	300	300,7	∞	0,414	†	12,5	25,1	∞	134,6	∞
	600	224,9	†	0,347	†	11,9	21,0		122,5	
	5	295,3	∞	0,469	∞	12,2	24,3	∞	113,4	
<i>Tagetes minuta</i>	50	262,2	†	0,462	∞	10,1	19,0		93,4	
	125	200,2	†	0,412	†	2,6	3,5	†	11,7	†
	250	188,1	†	0,401	†	2,3	3,1	†	17,0	†
	5	288,9	∞	0,461	∞	11,8	23,1		115,4	
<i>Thymus vulgaris</i>	50	303,5	∞	0,457	∞	13,4	28,2	∞	137,5	∞
	150	287,5	∞	0,427	†	12,1	23,9	∞	124,9	∞
	300	236,4	†	0,352	†	10,9	17,9		108,9	
S.E. ²		9,76		0,0190		1,54	5,19		27,99	
p-value		< 0.001		< 0.001		< 0.001	< 0.001		< 0.001	

Table 4. Effect of essential oils on total gas (mL/g OMi), in vitro fiber digestibility (D-NDFom; g/g), and methane production (%; mg/g OMi and mg/g NDFom digested).

Notes: † Means within a column differ from control (p < 0.05); ∞ Means within a column differ from monensin (p < 0.05); 1 D-NDFom: *in vitro* digestibility of ash free neutral detergent fiber; 2 NDFom d: organic matter neutral detergent fiber digested; 3 S.E.: standard error.

Intermediate to high level of inclusion for some EO (e.g. *A. gratissima* at 300 mg/L and *O. vulgare ssp. hirtum* var. Mendocino at 150 and 250 mg/L) reduced fiber digestibility with no effect on gas production. Thus, when evaluating additives to modify

rumen fermentation activity, care should be taken if using gas production as the only indicator of overall fermentation.

Except for *E. globulus* and *L. turbinata*, every variable measured was significantly reduced with the higher level of

inclusion compared to the control (methane, D-NDFom and gas production), representing that overall microbial activity was affected. This is in agreement with the dose-response effects previously reported for EO (Khiaosa-ard and Zebeli, 2013; Klevenhusen et al., 2012).

Essential oils from native Argentinean plants have proven biological activity in several processes (Fuselli et al., 2006; García et al., 2003; Tereschuk et al., 1997); however, to our knowledge, they have not been previously evaluated to modify rumen microbial function. Therefore, the discussion will be approached by the compounds present in those EO.

Limonene is the main compound in *L. turbinata*, and it is also present in *S. molle* and *T. minuta*. Castillejos et al. (2006) reported toxic effects of limonene at levels of 50 and 500 mg/L, and concluded that there appears to be no benefit in using limonene as an additive to modify rumen microbial fermentation. On the contrary, in our study, among all the oils evaluated, *L. turbinata* (60.8% limonene) was the most effective at all inclusion levels, reducing methane by half compared to control, and showing 35 to 85% reduction when compared to monensin, without affecting fiber digestibility. With the other two EO that contain limonene, *S. molle* and *T. minuta*, fiber digestibility was severely affected at higher doses; however, in these EO limonene, represents the third main compound (13.8 and 6.0% respectively).

Low levels of *A. gratissima* had no effects on any of the variables measured, and at the highest level (300 mg/L), this EO affected the fiber digestibility with no effects on methane. At the doses tested this EO did not represent a promising alternative to inhibit methane production *in vitro*.

At the dose range tested for *E. globulus*, which is comparable with the range of doses evaluated for the rest of EO in this study, we did not find any effects on the variables studied. The absence of effect suggests low antimicrobial activity of this EO, being necessary higher levels than those evaluated here. In this regard, Patra and Yu (2012) observed a linear reduction in gas and methane production at levels ranging from 250 mg/L to 1000 mg/L. Doses in the present study may have been low to detect the effects of this EO on rumen fermentation *in vitro*.

Mentha x piperita had no impact on fermentation at low levels. An inhibition of methane was achieved by increasing the dose; however, it was associated with a reduction in fiber digestion. The adverse effect caused by *M. x piperita* on the microbial population, and on cellulolytic bacteria in particular (Patra and Yu, 2014, 2012), can explain the reduction in fiber digestibility observed for levels of 200 and 400 mg/L.

The reduction in fiber digestibility found for both cultivars of *O. vulgare* at high levels of inclusions are in accordance with previous reports (Busquet et al., 2006; Cardozo et al., 2005; Castillejos et al., 2008). Busquet et al. (2006) evaluated different EO and their main components and concluded that carvacrol is the main active compound in oregano oil. In the present study, carvacrol was found in small proportion (0.001% for Compacto and 4% for Mendocino); and *trans* sabinene hydrate, thymol and γ -terpinene were the main components. It is important to highlight that even

though the composition of EO of both cultivars was similar, the effects found for the same level of inclusion (250 mg/L) differed markedly between them, being the ecotype Compacto more effective than Mendocino.

Based on our results, we can suggest that *R. officinalis* has a strong antimicrobial activity and that the optimal inclusion level may be difficult to define because there is a narrow range of doses between those showing desirable effects (methane production inhibition) and those having negative effects (reduction of fiber degradation). Severe reduction of all the variables measured were registered at doses over 300 mg/L, which is not in agreement with the findings of Castillejos et al. (2008) who reported no reduction on rumen fermentation products (ammonia and VFA) at levels of 500 mg/L.

Only high levels of *T. vulgaris* affected gas production and fiber digestion; however, this effect was not accompanied by a reduction in methane production. When evaluating thyme oil at 5, 50 and 500 mg/L, Castillejos et al. (2008) found an increase in total VFA at all doses of the oil, while an inclusion of its main component, thymol at 500 mg/L reduced total VFA concentration by around 30% (Castillejos et al., 2006). These results indicate that the action of the main compounds isolated may not directly have the same behavior of the primary complex mixture of chemical structures.

An explanation of this phenomenon is the interaction that may occur between compounds, such as the synergic effect of p cymene in carvacrol/thymol-based EO (Macheboeuf et al., 2008). In addition, EO comprise a large number of we consider it is essential a large number of components and it is likely that their mode of action involves several targets in the bacterial cells (Castillejos et al., 2006).

The diversity in EO composition, which depends on environmental conditions and genetic aspects, results in different bioactivity of the EO related to plant ecotype and origin. Hence, when using plants as source of oil, we considered it is essential to include a description of the EO composition as part of the study.

CONCLUSIONS

Essential oils from native Argentinean plants are capable of modifying rumen fermentation *in vitro*. *Lippia turbinata* is a promising natural alternative to in-feed antibiotics, considering that it has great potential to reduce enteric methane production without affecting digestibility.

Considering the complex composition of essential oils and their resulting bioactivity, a description of the chemical composition should be included in this kind of evaluations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was completed at the National Institute of Agricultural Research (INTA Manfredi's Experimental Station, Cordoba, Argentina), and was made possible by a grant from the National Program of Animal Production of INTA (PNPA-1126023).

REFERENCES

- BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 338–355. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024
- BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89, 761–771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3
- CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90, 2580–2595. doi:10.3168/jds.2006-644
- CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 2572–2579.
- CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *J. Dairy Sci.* 89, 2649–2658. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-4
- CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; MARTÍN-TERESO, J.; TER WIJLEN, H. 2008. In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 259–270. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.037
- CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal* 7, 253–265. doi:10.1017/S1751731113000852
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2011. *InfoStat*.
- FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23, 213–226. doi:10.1002/ffj.1875
- FUSELLI, S.R.; GARCÍA DE LA ROSA, S.B.; GENDE, L.B.; EGUARAS, M.J.; FRITZ, R. 2006. Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus* larvae, causal agent of American foulbrood (AFB). *J. Apic. Res.* 45, 02–07.
- GARCÍA, C.C.; TALARICO, L.; ALMEIDA, N.; COLOMBRES, S.; DUSCHATZKY, C.; DAMONTE, E.B. 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytother. Res.* 17, 1073–1085. doi:10.1002/ptr.1305.
- GARCÍA, F.; MARTÍNEZ FERRER, J.; CORA, A.; BRUNETTI, M.A.; FROSSASCO, G.; LUCINI, E.; MORENO, M.V.; MARTÍNEZ, M.J.; COLOMBATTO, D. 2014. Effect of increasing doses of essential oils on in vitro ruminal fermentation, in: *Revista Argentina de Producción Animal Vol. 34 (Supl. 1)*. 387 p.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483–2492.
- KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *J. Anim. Sci.* 91, 1819–1830. doi:10.2527/jas2012-5691
- KLEVENHUSEN, F.; MURO-REYES, A.; KHIAOSA-ARD, R.; METZLER-ZEBELI, B.U.; ZEBELI, Q. 2012. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 61–69. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.008
- LIN, B.; WANG, J.H.; LU, Y.; LIANG, Q.; LIU, J.X. 2013. In vitro rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 97, 1–9. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01236.x
- MACHEBOEUF, D.; MORGAVI, D.P.; PAPON, Y.; MOUSSET, J.-L.; ARTURO-SCHAAN, M. 2008. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 335–350. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.044
- PATRA, A.K.; YU, Z. 2014. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 897–905. doi:10.1007/s00253-013-4930-x
- PATRA, A.K.; YU, Z. 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4271–4280. doi:10.1128/AEM.00309-12
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1–6.
- STEINFELD, H.; GERBER, P.; WASSENAAR, T.; CASTEL, V.; ROSALES, M.; DE HAAN, C. 2006. *Livestock's long shadow: Environmental issues and options*, FAO, Rome, Italy,. doi:10.1007/s10666-008-9149-3
- TERESCHUK, M.L.; RIERA, M.V.Q.; CASTRO, G.R.; ABDALA, L.R. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tageetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.* 56, 227–232. doi:10.1016/S0378-8741(97)00038-X
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197. doi:10.1016/0377-8401(94)90171-6
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111. doi:10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- WALLACE, R.J.; CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. 1981. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 46, 131–148. doi:10.1079/BJN19810016

Pureza física y germinación de cariopses de *Chloris gayana* Kunth y *Panicum coloratum* L. cosechados de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico

GARCÍA, M.D.¹; PESQUEIRA, J.¹; OTONDO, J.²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la pureza física, el porcentaje de germinación (G), la velocidad de germinación (VG) de cariopses de *Chloris gayana* cv. Finecut (*Cg*) y *Panicum coloratum* cv. Klein Verde (*Pc*) recolectados de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico (pH = 9,8 y $CE_e = dS\ m^{-1}$ y PSI, PSI = 26,2%). Para comparar la G de ambas especies, 50 cariopses (n = 4) se incubaron en agua. Para evaluar la respuesta de la G a la salinidad y a la alcalinidad se realizó un experimento con diseño completamente aleatorizado y estructura factorial (n = 4) de dos especies x cuatro concentraciones de sales de Na⁺ (25, 50, 100 y 150 mM) x dos pH (6 y 10). Los tratamientos consistieron en combinaciones 1:1 de NaCl + SO₄Na (pH = 6) y Na₂CO₃ + NaHCO₃ (pH = 10): 25mM-pH6 (control); 25mM-pH10; 50mM-pH6; 50mM-pH10; 100mM-pH6; 100mM-pH10; 150mM-pH6 y 150mM-pH10. Muestras del material obtenido de la dispersión natural de panojas de *Cg* y *Pc* contenían (media ± EEM; % del peso total): cariopses cubiertos por las glumas (53 ± 2,6; 41,3 ± 4,6), cariopses aislados (1,4 ± 0,6; 10,3 ± 1,95), cariopses vacíos (32,9 ± 2,4; 22,7 ± 2,4) y material inerte (12,5 ± 2,2; 25,7 ± 2,1). En agua, los valores (media ± EEM) de G (%) y VG (%) de *Cg* (96,5 ± 2,4 y 54,7 ± 7) y *Pc* (89,2 ± 3,6 y 51,7 ± 5,5) fueron similares. En presencia de 25 mM de sal, el incremento del pH de 6 a 10 no inhibió la G de *Cg* (94,4 ± 2,55 y 90,7 ± 3,7) ni de *Pc* (93,9 ± 2,2 y 92,95 ± 1,9). La incubación en 50mM-pH=10 inhibió la G de *Pc* (33,2 ± 4,7), pero no la de *Cg* (93,5 ± 3,3). La solución 100mM-pH=10 inhibió mucho más la germinación de *Pc* (2,5 ± 1,5) que la de *Cg* (66,35 ± 5,5), y 150mM-pH10 inhibió fuertemente la germinación de *Cg* (3,5 ± 1,5) y *Pc* (0 ± 0). En las soluciones con pH = 6, la G de *Cg* y *Pc* no se vio afectada hasta 100 mM de sal, pero en 150 mM se redujo 25% y 20%, respectivamente, en relación con la observada en 25mM-pH=6. La VG también se redujo más por la alcalinidad en *Pc* que en *Cg*. La VG de ambas especies respondió de manera similar a los incrementos de salinidad en las soluciones neutras (pH = 6). La VG de los cariopses incubados en 50mM-pH=6 no se diferenció del control en ninguna de las dos especies. Con cada incremento superior a 50 mM, la VG disminuyó en ambas especies, en relación con el control respectivo.

Palabras clave: salinidad, alcalinidad, poácea forrajera megatérmica, velocidad de germinación.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate physical purity, germination percentage (G) and germination velocity (GV) of caryopses of *Chloris gayana* cv. Finecut (*Cg*) and *Panicum coloratum* cv. Klein Verde (*Pc*)

¹Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Facultad de Ciencias Agrarias, Ruta 4 km 2 (1836) Llavallol, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Cuenca del Salado, (7130) Chascomús, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: mariadinagarcia@yahoo.com

collected from plants grown in an alkaline-sodic soil ($\text{pH} = 9.8$, $\text{EC}_e = 0.69 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{EPS} = 26.2\%$). To compare G of both species, 50 caryopses ($n = 5$) were incubated in deionized water. To evaluate G responses to salinity and alkalinity, an experiment with completely randomized design and factorial structure ($n = 4$) of two species \times four concentrations of Na^+ -salts (25, 50, 100 and 150 mM) \times two pHs (6 and 10) was performed. Treatments consisted in combinations 1:1 of $\text{NaCl} + \text{SO}_4\text{Na}$ ($\text{pH} = 6$) and $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ ($\text{pH} = 10$): 25mM-pH6 (control); 25mM-pH10; 50mM-pH6; 50 mM-pH10; 100mM-pH6; 100mM-pH10; 150mM-pH6 and 150mM-pH10. Samples of the natural-dispersal material from panicles of Cg and Pc contained (mean \pm SEM; % of total weight): caryopses covered by glumes (53 ± 2.6 ; 41.3 ± 4.6), isolated caryopses (1.4 ± 0.6 ; 10.3 ± 1.95), empty caryopses (32.9 ± 2.4 ; 22.7 ± 2.4) and inert materials (12.5 ± 2.2 ; 25.7 ± 2.1). Caryopses of Cg and Pc incubated in water showed similar values (mean \pm SEM, in %) of G (96.5 ± 2.4 and 89.2 ± 3.6) and GV (54.7 ± 7 and 51.7 ± 5.5). In the presence of salt 25 mM, the increment of pH from 6 to 10 did not inhibit G of Cg (94.4 ± 2.55 and 90.7 ± 3.7) or Pc (93.9 ± 2.2 and 92.95 ± 1.9). Incubation in 50mM-pH=10 inhibited G of Pc (33.2 ± 4.7) but not G of Cg (93.5 ± 3.3). The solution 100mM-pH=10 inhibited more the germination of Pc (2.5 ± 1.5) than that of Cg (66.35 ± 5.5), and 150mM-pH10 strongly inhibited germination of both species, Cg (3.5 ± 1.5) and Pc (0 ± 0). In solutions with $\text{pH} = 6$, the G of Cg and Pc was not affected up to 100 mM of salt, but 150 mM induced decreases of 25 % and 20 % of G, respectively, in relation to that observed in 25mM-pH=6. The increment of pH also affected more GV of Pc than that of Cg. GV of both species responded in a similar way to increases of salinity in neutral ($\text{pH} = 6$) solutions. The GV of the caryopses incubated in 50mM-pH=6 did not differ from their respective controls. From 50 mM, each increase of salt concentration induced the decrease of GV of both species, relative to their respective controls.

Keywords: salinity, alkalinity, megathermic forage poaceae, germination velocity.

INTRODUCCIÓN

La FAO/UNESCO estima que la superficie global afectada por la salinidad y la alcalinidad supera las 900 millones de hectáreas (Wicke *et al.*, 2011). En la provincia de Buenos Aires, por ejemplo, 7 millones de ha (24% de la superficie de la provincia) están ocupadas por suelos con problemas de hidrohalomorfismo (Miaczynski, 1995), la gran mayoría de los cuales se ubican en la Cuenca del Salado. Dentro de los suelos que predominan en esta cuenca se encuentran los Natracualfes y Natralcuoles típicos, que a nivel provincial abarcan más de 4,7 millones de ha ($\cong 15,66\%$ de la superficie total). Estos suelos poseen un horizonte arcilloso, de baja permeabilidad y alto contenido de sales sódicas (Miaczynski, 1995). Las condiciones mencionadas generan un ambiente edáfico restrictivo para la germinación y el crecimiento de la mayoría de las especies vegetales, sobre todo cuando los factores mencionados se combinan en un mismo suelo (salinidad, alcalinidad y anegamiento o sequía).

Existen numerosos estudios sobre los efectos de la salinidad en la germinación y el crecimiento de las plantas, pero hay poca información sobre los efectos de la alcalinidad. En los últimos años se incrementaron los estudios sobre los efectos de la alcalinidad sobre la germinación de las semillas, el crecimiento y el metabolismo de las plantas. En estos estudios, la alcalinización y estabilización del pH de la solución nutritiva normalmente se ha logrado mediante el agregado del tampón Tris(hidroximetil)amino-metano (lo que permite independizar completamente el pH de la concentración de sal) (Singh *et al.*, 2002; Avaca *et al.*, 2015), o mediante la combinación de diferentes proporciones y concentraciones de bicarbonato y carbonato

de Na^+ (lo cual genera soluciones con distintos niveles de alcalinidad y salinidad) (Guo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Estas investigaciones han mostrado que las sales de sodio alcalinas (NaHCO_3 y Na_2CO_3) producen un efecto más perjudicial que concentraciones equimolares de sales neutras (NaCl y Na_2SO_4) sobre las plantas. Por ejemplo, la germinación de las semillas se inhibió más en presencia de sales alcalinas que de sales neutras en *Medicago sativa* L. (Li *et al.*, 2010), *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvelev (Ma *et al.*, 2015), *Medicago ruthenica* (L.) Sojak, (Guan *et al.*, 2009), *Chloris virgata* Sw. (Lin *et al.*, 2015), *Triticum aestivum* L. (Guo *et al.*, 2010), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Zhao *et al.*, 2014), *Panicum virgatum* L. (Lui *et al.*, 2014), *Chloris gayana* Kunth y *Panicum coloratum* L. (García *et al.*, 2015), *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (Guo *et al.*, 2011), *Helianthus annuus* L. (Liu *et al.*, 2010), diversas especies para césped (Zhang y Rue, 2014), entre otras.

Panicum coloratum L. y *Chloris gayana* Kunth son poáceas perennes subtropicales caracterizadas por una elevada producción de biomasa de un valor nutricional adecuado para satisfacer los requerimientos del rodeo de cría vacuno (Avila *et al.*, 2012). La implantación de *C. gayana* y *P. coloratum* logran incrementar la productividad respecto de la comunidad natural de halófitas, aunque no superan su calidad nutricional (Otondo, 2011). Además presentan tolerancia a la sequía (Ghannoum, 2009; Ponsens *et al.*, 2010), salinidad (Ribotta *et al.*, 2013), periodos cortos de anegamiento (Imaz *et al.*, 2015), alcalinidad (García *et al.*, 2015; Avaca *et al.*, 2015) y tolerancia moderada a las heladas (Jones, 1969; Pesqueira *et al.*, 2016). Estas características las hacen interesantes para su cultivo en la zona de la Depresión del Salado.

P. coloratum cv. Klein verde y *C. gayana* cv. Finecut se sembraron en el año 2012 en la Chacra Experimental Integrada Chascomús (Buenos Aires) en un suelo con $\text{pH} = 9,8$; $\text{CE}_e = 0,69 \text{ dS m}^{-1}$ y $\text{PSI} = 26,2\%$. La emergencia y la producción de biomasa de *P. coloratum* y *C. gayana* el año de implantación fueron similares (Otondo *et al.*, 2014). Luego de tres años, *P. coloratum* cv. Klein produjo 36% más biomasa que el promedio del pastizal natural, *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Liu & Wang y *C. gayana* (Pesqueira *et al.*, 2015).

P. coloratum presenta una floración muy heterogénea, semillas que maduran irregularmente y están dormidas al momento de la dispersión. La forma de reproducción es principalmente por semillas, las cuales pierden por completo la dormición luego de 6 meses de posmadurado (Petruzzi y Stritzler, 2003). *C. gayana* se propaga vegetativamente a través de estolones, la floración se concentra en la primera mitad del otoño y produce gran cantidad de semillas con elevado poder germinativo, lo cual favorece la resiembra y rápida cobertura del suelo (Avila *et al.*, 2012). Sin embargo, bajo las condiciones de cultivo de las parcelas establecidas en Chascomús, durante las evaluaciones de cobertura realizadas en primavera-verano no se observa el nacimiento de plántulas nuevas de *C. gayana* ni de *P. coloratum*, a pesar de que las plantas establecidas producen abundante semilla cada verano (datos no mostrados). El ambiente en el cual crece la planta madre puede afectar diversas características de las semillas, por ejemplo la producción, el peso, la viabilidad, el nivel de dormición, entre otras (Fenner, 1991). Young y Evans (1981) observaron que la emergencia y crecimiento de plántulas de *Elymus cinereus* (Scribn. & Merr.) A. Löve en un suelo salino/alcalino fue mejor a partir de semillas obtenidas de plantas que habían crecido en un suelo no alcalino que de plantas que habían crecido en un suelo salino-alcalino. En cambio, Koryo y Eisa (2008) observaron que plantas de *Chenopodium quinoa* Willd. cultivadas en soluciones nutritivas que contenían 100, 300 o 500 mM de NaCl produjeron semillas con mayor velocidad de germinación en medios salinos que las semillas obtenidas de plantas que habían crecido en soluciones nutritivas sin el agregado de NaCl.

Hasta el presente no se han publicado datos sobre los atributos de calidad (pureza, poder germinativo y velocidad germinativa) de las semillas producidas por plantas de *C. gayana* y *P. coloratum* cultivadas en suelos alcalino-sódicos. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la pureza física, la germinación final (G) y la velocidad de germinación (VG) de cariopses de *Chloris gayana* cv. Finecut (*Cg*) y *Panicum coloratum* cv. Klein Verde (*Pc*) cosechadas de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Unidades de dispersión (cariopses cubiertos por las glumas y glumelas) cosechadas de plantas de *Chloris gayana* cv. Finecut (*Cg*) y *Panicum coloratum* cv. Klein Verde (*Pc*) que crecen en un suelo Natracualf típico con $\text{pH} = 9,8$, con-

ductividad eléctrica del extracto acuoso, $\text{CE}_e = 0,69 \text{ dS m}^{-1}$ y porcentaje de sodio intercambiable, $\text{PSI} = 26,2\%$.

Métodos

Las inflorescencias se envolvieron con tul translúcido desde el 9 de marzo al 10 de abril de 2015 para recolectar los cariopses dispersados naturalmente durante ese periodo. La pureza física se determinó a partir de 10 submuestras de cada especie, de las cuales se tomaron los pesos parciales de las siguientes fracciones: unidades de dispersión, cariopses desnudos, cariopses vanos o vacíos y material inerte. Debido a la baja germinación (media \pm EEM, en %) que mostraron los cariopses de *Pc* ($26,4 \pm 3,4$) se realizó un pretratamiento con H_2SO_4 para romper la dormición. El pretratamiento consistió en la inmersión de las unidades de dispersión con cariopses desarrollados de *Pc* en H_2SO_4 concentrado durante 10 minutos (50 cariopses por ml), seguido de tres enjuagues consecutivos con: i) agua helada (enfriada a 0°C con hielo), ii) solución 1 M de NaHCO_3 para neutralizar y iii) agua helada (adaptado de Voigt y Tischler, 1997).

Para evaluar la respuesta de la germinación a la salinidad/alcalinidad de la solución de incubación se realizó un experimento con diseño completamente aleatorizado y estructura factorial de dos especies x cuatro concentraciones de sales de Na^+ x dos pH, con cuatro repeticiones. Los tratamientos consistieron en combinaciones 1:1 de sales de Na^+ neutras ($\text{NaCl} + \text{SO}_4\text{Na}$, $\text{pH} = 6$) o alcalinas ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$, $\text{pH} = 10$) en las siguientes concentraciones (mM): 25, 50, 100 y 150 (tabla 1). A los 40 días de la recolección se seleccionaron las unidades de dispersión que contenían cariopses desarrollados (en adelante llamados cariopses) y se colocaron en cajas de Petri de 9 mm sobre dos discos de papel de filtro (50 cariopses por caja) embebidos en agua desionizada para determinar el poder germinativo o en la solución del tratamiento correspondiente (tabla 1) para evaluar la respuesta a la salinidad/alcalinidad. Las cajas se mantuvieron 26 días bajo un régimen alterno de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a temperaturas (media \pm EEM, $^\circ\text{C}$) de $28,00 \pm 0,14$ y $23,04 \pm 0,08$, respectivamente. Los datos se sometieron al análisis de la varianza, y cuando este detectó diferencias significativas, las medias se separaron mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa de Fisher, $p \leq 0,005$, con el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

El porcentaje de germinación se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$G (\%) = \frac{\text{número de cariopses germinados}}{\text{número total de cariopses}} \times 100$$

La VG se estimó mediante el índice de VG de Timson (Timson, 1965) modificado:

$$\text{VG} (\% \text{ día}^{-1}) = \sum G/t$$

Donde G es el porcentaje de cariopses nuevos germinados en cada conteo y t son los días transcurridos hasta ese conteo (Zhang y Rue, 2014).

Tratamiento	pH	CE _s (dS m ⁻¹)	Concentración (mM) de sal			
			NaCl	SO ₄ Na ₂	NaHCO ₃	Na ₂ CO ₃
N25 (control)	6	4,24	12,5	12,5	0	0
N50	6	7,28	25	25	0	0
N100	6	12,35	50	50	0	0
N150	6	19,15	75	75	0	0
A25	10	3,31	0	0	12,5	12,5
A50	10	6,16	0	0	25	25
A100	10	11,32	0	0	50	50
A150	10	16,01	0	0	75	75

Tabla 1. Composición salina, pH y conductividad eléctrica (CE_s) de las soluciones de incubación (tratamientos) de los cariopses.

RESULTADOS

El peso total de las muestras recolectadas a partir de la dispersión de las panojas de *Cg* y *Pc* estaba compuesto por 54% y 52%, respectivamente, de cariopses desarrollados (tanto cubiertos por las glumas como desnudos), el resto por cariopses vacíos y materiales inertes (tabla 2).

Los valores (media ± EEM) de G (%) y VG (% d⁻¹) de los cariopses incubados en agua fueron similares para *Cg* (96,5 ± 2,4 y 54,7 ± 7,9, respectivamente) y *Pc* (89,2 ± 3,6 y 51,7 ± 5,5, respectivamente), los últimos pretratados con H₂SO₄. Además, los valores de G y VG de ambas especies en N25 (figuras 1 a y b) no se diferenciaron de los valores obtenidos en agua, por lo cual el tratamiento N25 se consideró como el control para evaluar los efectos de la salinidad y el pH sobre la germinación.

Los tres factores evaluados y su interacción afectaron la G ($p < 0,001$). Los cariopses de *Cg* y *Pc* incubados en A25 mostraron porcentajes de G similares a los incubados en N25 (figura 1a). En cambio, la G de *Pc* se inhibió más que la de *Cg* en los cariopses incubados en A50 y A100. La solución A150 inhibió fuertemente la germinación de ambas especies (figura 1a). Los cariopses incubados en soluciones con pH = 6 mostraron valores similares de G con concentraciones salinas hasta 100 mM. En cambio, los cariopses de *Cg* y *Pc* incubados en N150 germinaron 25% y 20% menos, respectivamente, que los incubados en N25 (figura 1a).

La interacción entre los tres factores evaluados fue significativa para la VG ($p = 0,006$) (figura 2b). Los cariopses de *C. gayana* mostraron mejor respuesta a la alcalinidad que los de *P. coloratum* con concentraciones bajas y moderadas de sal. Los cariopses de *P. coloratum* incubados en N25, N50 y N100 mostraron mayor VG que los de *C. gayana*. El incremento del pH en estas concentraciones salinas (A25, A50 y A100) indujo la disminución de la VG de *P. coloratum*, pero no la de *C. gayana*, con respecto a la VG en N25, N50 y N100, respectivamente (figura 1b). Por el contrario, en presencia de 50 mM de sal, el aumento del pH incrementó la VG de *Cg* un 31%. El incremento del pH en presencia de 150 mM de sal indujo una fuerte disminución de la VG de ambas especies (figura 1b). En las soluciones neutras (pH = 6) la VG también disminuyó con incrementos en la concentración salina, con respecto al control respectivo, a partir de N50 (figuras 1b y 2).

DISCUSIÓN

Por un lado, a partir de muestras de la dispersión natural de panojas de plantas de *C. gayana* y *P. coloratum* cultivadas en un suelo alcalino/sódico se observó que el 54% y 52% del peso total está formado por cariopses desarrollados (cubiertos por las glumas + desnudos), los cuales muestran un poder germinativo de 96% y 89%, respectivamente. Estos porcentajes de germinación son similares a los observados en muestras comerciales de *Cg* (Avaca

Especie	Fracción (% sobre el peso total)				Poder germinativo (%)
	Unidades de dispersión con cariopses desarrollados	Cariopses desnudos desarrollados	Unidades de dispersión con cariopses vacíos	Material inerte	
<i>C. gayana</i>	53,0 ± 2,6	1,4 ± 0,6	32,9 ± 2,4	12,5 ± 2,2	96,5 ± 2,4
<i>P. coloratum</i>	41,3 ± 4,6	10,3 ± 1,95	22,7 ± 2,4	25,7 ± 2,1	89,2 ± 3,6

Tabla 2. Pureza física y Poder Germinativo (%) de cariopses de *C. gayana* cv. Finecut y *P. coloratum* cv. Klein Verde recolectados a partir de la dispersión natural de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico. Valores: media ± EEM.

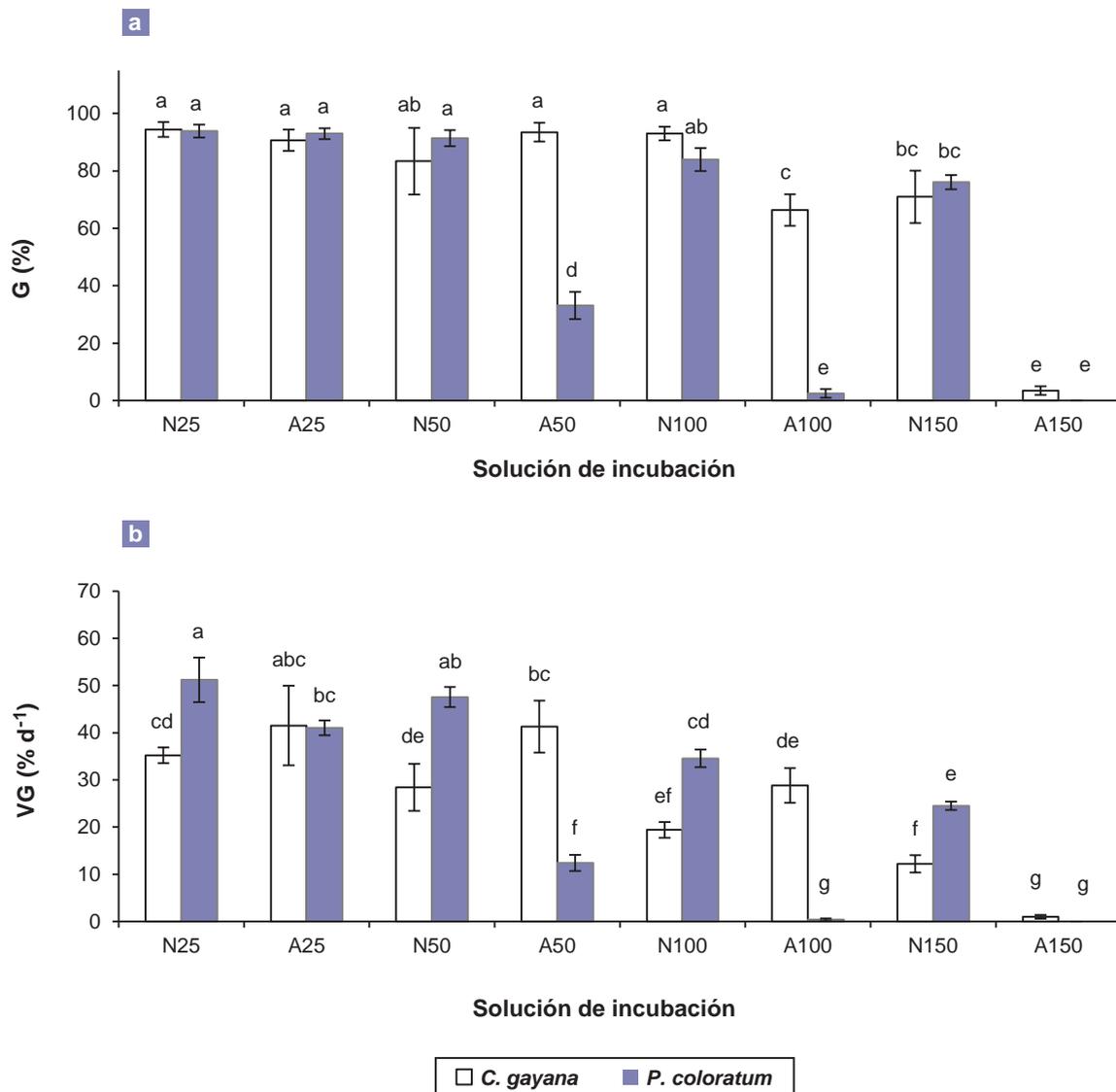


Figura 1. Germinación final (a) y velocidad de germinación (b) de cariopos de *C. gayana* cv. Finecut y *P. coloratum* cv. Klein Verde recolectados de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico e incubados 26 días en soluciones con diferentes concentraciones de sales Na⁺ (25, 50, 100 y 150 mM) neutras (pH = 6: N25, N50, N100 y N150) y alcalinas (pH = 10: A25, A50, A100 y A150). Letras diferentes indican diferencia significativa según la prueba de Diferencia Mínima Significativa de Fisher, $p \leq 0,05$.

et al., 2015) y *Pc* (Lauric *et al.*, 2014). Por otro lado, semilla comercial de *Cg* cv. Finecut muestra un porcentaje de viabilidad de aproximadamente 50% (sobre el total de la muestra) (Avaca *et al.*, 2015) y muestras de semillas de *Pc* comerciales de diverso origen muestran una variabilidad alta, entre 31% y 98%, en la pureza (porcentaje de semilla verdadera sobre el total de la muestra) (Lauric *et al.*, 2014).

En condiciones de alta alcalinidad y baja salinidad, por ej. pH = 10 y $CE_s = 3,3 \text{ dS m}^{-1}$, los cariopos de *Cg* y *Pc* muestran porcentajes de germinación similares a los cariopos incubados en agua. Estos niveles de conductividad eléctrica y pH son apenas superiores a los observados en suelos donde se cultivaron las plantas madre (pH = 9,8 y $CE_s = 0,7 \text{ dS m}^{-1}$).

Aun en las soluciones alcalinas con un nivel moderado de salinidad ($CE_s = 6 \text{ dS m}^{-1}$) la germinación de *Cg* no se modificó y el 31% de los cariopos de *Pc* fueron capaces de germinar. En el suelo donde se cultivan estas plantas, estos valores de conductividad de la solución edáfica (CE_e) son esperables cuando baja el contenido de agua del suelo y se concentran las sales (Hussain *et al.*, 2002). Por lo tanto, la producción de semillas viables y los niveles de conductividad eléctrica y pH del suelo indican que podría producirse la resiembra natural de ambas especies. Sin embargo, en el suelo existen otros factores que pueden afectar la viabilidad de las semillas dispersadas que quedan en la superficie durante el invierno y consecuentemente su posterior

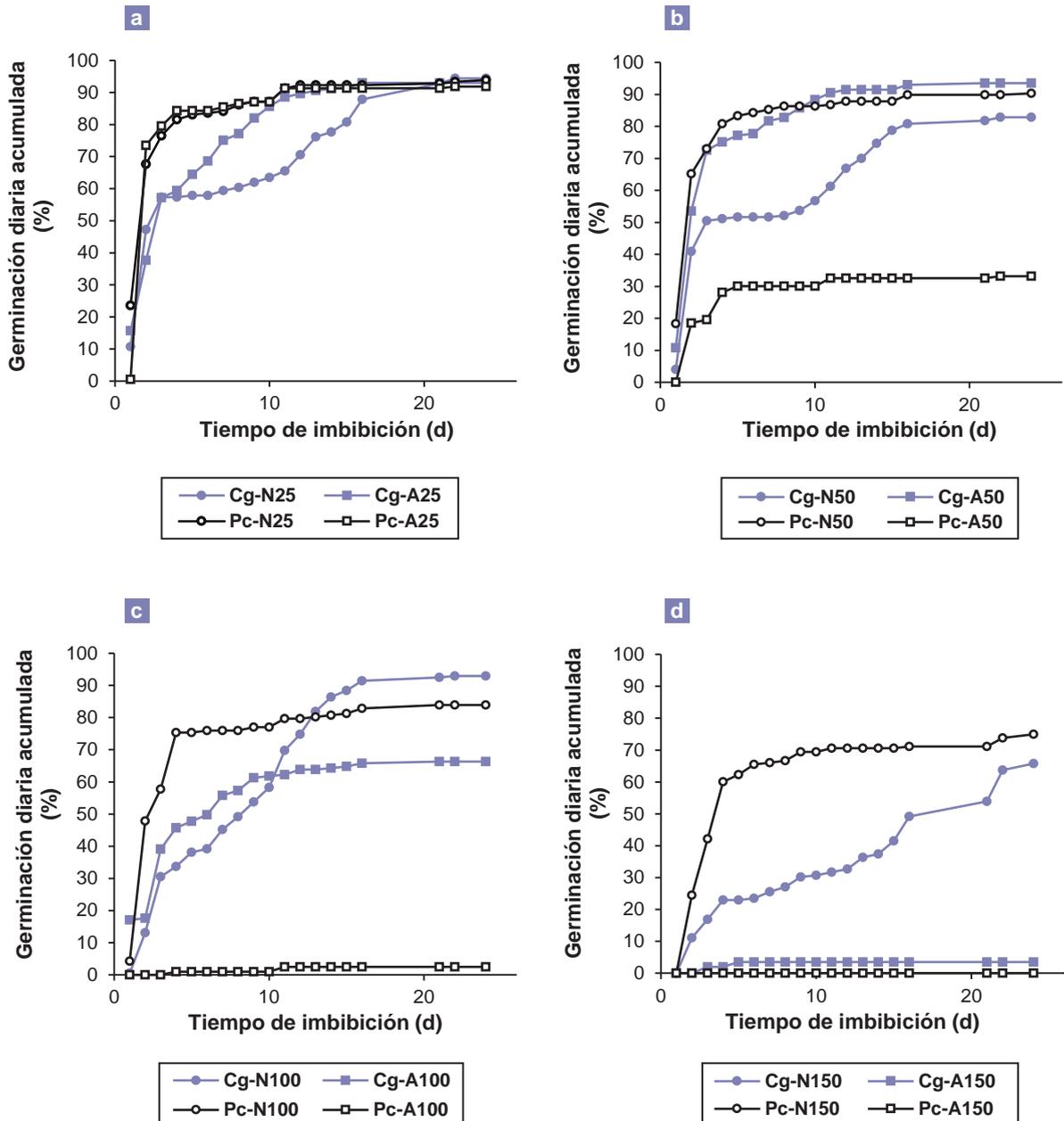


Figura 2. Evolución de la germinación de cariopses de *C. gayana* cv Finecut (*Cg*) y *P. coloratum* CV Klein Verde (*Pc*) incubados en diferentes concentraciones de sales de Na⁺ (mM): 25 (a), 50 (b), 100 (c) y 150 (d). Sales neutras (pH=6): N25 y N50, N100, N150. Sales alcalinas (pH = 10): A25 y A50, A100, A150. Los cariopses se recolectaron de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico.

germinación, por ejemplo, variaciones en la disponibilidad de agua, en la temperatura, aumento de la compactación (Martín *et al.*, 2012), etc. En el suelo, donde fueron cosechadas las semillas de ambas especies la siembra a 0,5 cm de profundidad incrementó la densidad de plantas de *Cg* y *Pc* 5 y 6 veces, respectivamente, comparada con la siembra superficial (Otondo *et al.*, 2014). Además, la cobertura de la especie dominante (Pesqueira *et al.*, 2015), sumada a la presencia de otras especies y de material vegetal muerto sobre la superficie del suelo, pudieron haber generado un

ambiente con una intensidad de luz demasiado baja para permitir el establecimiento de la plántula.

La G de los cariopses obtenidos de plantas cultivadas en un suelo alcalino/sódico es similar a la G de los cariopses de semillas comerciales. Las respuestas de la G a la salinidad son similares para ambas especies, pero *C. gayana* es más tolerante a la alcalinidad (figuras 1 y 2) (García *et al.*, 2015).

En varias especies para césped también se observó que la germinación no se inhibe en presencia de alcalinidad

combinada con niveles bajos de salinidad (Zhang y Rue, 2014). Sin embargo, con concentraciones crecientes de sales de Na⁺, el efecto perjudicial sobre la G y la VG es más marcado en presencia de sales alcalinas que de sales neutras. Especies con diferentes niveles de tolerancia a la salinidad/alcalinidad mostraron la misma respuesta, por ejemplo *Medicago sativa* (Li *et al.*, 2010), *Triticum aestivum* (Guo *et al.*, 2010), *Sorghum bicolor* (Zhao *et al.*, 2014), *Medicago ruthenica* (Guan *et al.*, 2009), *Panicum virgatum* (Lui *et al.*, 2014), *Chloris gayana* y *Panicum coloratum* (García *et al.*, 2015), entre otras.

En presencia de niveles similares de salinidad y alcalinidad elevada, *C. gayana* mostró mayor G y VG que *Chloris virgata* (Lin *et al.* 2015), una especie anual natural de suelos alcalinos del noreste de China, muy tolerante a la salinidad y alcalinidad. Sin embargo, *Pc* es más sensible que *Cg* a la alcalinidad pero no a la salinidad elevada.

CONCLUSIONES

A partir del análisis del material proveniente de la dispersión natural de panojas de plantas de *Cg* y *Pc* cultivadas en un suelo alcalino/sódico se realizaron las siguientes observaciones:

- La fracción que contiene cariopses desarrollados (unidades de dispersión + cariopses desnudos) representa el 51,6% y 54,4% del peso total de las muestras de *Pc* y *Cg*, respectivamente.
- Cariopses desarrollados de *Pc* (luego del tratamiento con ácido sulfúrico) y de *Cg* incubados en agua presentan valores similares de G y VG (figura 1).
- Una alcalinidad elevada (pH = 10) no inhibe la germinación de *Cg* en presencia de valores bajos a moderados de salinidad (hasta 50 mM).
- Una alcalinidad elevada (pH = 10) no inhibe la germinación de *Pc* en presencia de valores bajos de salinidad (hasta 25 mM).
- En las soluciones neutras (p = 6), los porcentajes de G de *Cg* y *Pc* son similares en presencia de 25, 50 y 100 mM y disminuyen levemente en presencia de 150 mM de sales de Na⁺ (figura 1a).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Subsidio Lomascyt II, periodo 2015-2107) y la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación (Subsidio para Proyectos Vinculación y Transferencia Tecnológica "Capacidades Universitarias para el Desarrollo Productivo" Amílcar Oscar Herrera, periodo 2014-2016).

BIBLIOGRAFÍA

AVACA, F.M.; GARCÍA, M.D.; PESQUEIRA, J. 2015. Efectos de la salinidad y la alcalinidad sobre la germinación y el crecimiento

vegetativo temprano de *Chloris gayana* Kunth. Universidad Católica Argentina. (Disponible: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efectos-salinidad-alcalinidad-germinacion.pdf> verificado: 10 de septiembre de 2015).

AVILA, R.E.; MARCO, O.D.; AGNUSDEI, M. 2012. Calidad nutritiva de láminas de *Chloris gayana* en estado vegetativo. Efecto de la reducción del tamaño foliar y envejecimiento. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 20(1-2), 17–27.

DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. ROBLEDO, C.W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

FENNER, M. 1991. The effects of the parent environment on seed germinability. Seed Sci. Res. 1, 75–84.

GARCÍA, M.D.; LA GRECA, C.L.; BERMÚDEZ, P.S.; MANUELA, G.A.; PESQUEIRA, J. 2015. Salinity and alkalinity effects on germination and time to 50% germination (T₅₀) of *Chloris gayana*, *Panicum coloratum* and *Panicum virgatum*. 5th International Symposium of Forage Breeding. (Disponible: <http://www.agro.uba.ar/> ISFB2015 verificado: 20 de octubre de 2015).

GHANNOUM, O. 2009. C₄ photosynthesis and water stress. Ann. Bot. 103, 635–44.

GUAN, B.; ZHOU, D.; ZHANG, H.; TIAN, Y.; JAPHET, W.; WANG, P. 2009. Germination responses of *Medicago ruthenica* seeds to salinity, alkalinity, and temperature. J. Arid Environ. 73(1), 135–138.

GUO, R.; SHI, L.; DING, X.; HU, Y.; TIAN, S.; YAN, D.; SHAO, S.; GAO, Y.; LIU, R.; YANG, Y. 2010. Effects of saline and alkaline stress on germination, seedling growth, and ion balance in wheat. Agron. J. 102(4), 1252–1260.

GUO, R.; ZHOU, J.; HAO, W.; GONG, D.; ZHONG, X.; GU, F.; LIU, Q.; XIA, X.; TIAN, J.; LI, H. 2011. germination, growth, photosynthesis and ionic balance in *Setaria viridis* seedlings subjected to saline and alkaline stress. Can. J. Plant Sci. 91(6), 1077–1088.

HUSSAIN, N.; MUJEEB, F.; SARWAR, G.; HASSAN, G.; ULLAH, M. 2002. Soil salinity/sodicity and groundwater quality changes in relation to rainfall and reclamation activities. Proceedings of the International Workshop on Conjunctive Water Management for Sustainable Irrigated Agriculture in South Asia. Islamabad, 91–99 pp.

IMAZ, J.A.; GIMÉNEZ, D.O.; GRIMOLDI, A.A.; STRIKER, G.G. 2015. Ability to recover overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. Crop Pasture Sci. 66(1), 100–106.

JONES, R.M. 1969. Mortality of some tropical grasses and legumes following frosting in the first winter after sowing. Trop. grasslands 3, 57–63.

KOYRO, H.W.; EISA, S.S. 2008. Effect of salinity on composition, viability and germination of seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. Plant Soil 302(1-2), 79–90.

LAURIC, A.; TORRES, C.C.; DE LEO, G.; MARINISSEN, A.; CERDÁ, C. 2014. Relevamiento de calidad de semilla de mijo perenne (*Panicum coloratum*) en la zona de Bahía Blanca para el ajuste de las densidades de siembra en los sistemas regionales. INTA, Cent. Reg. Buenos Aires Sur 1–16.

LI, R.; SHI, F.; FUKUDA, K.; YANG, Y. 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Soil Sci. Plant Nutr. 56(5), 725–733.

LIN, J.; SHAO, S.; WANG, Y.; QI, M.; LIN, L.; WANG, Y.; YAN, X. 2016. Germination responses of the halophyte *Chloris virgata* to temperature and reduced water potential caused by salinity, alkalinity and drought stress. Grass Forage Sci. 71(3), 507–514.

LIU, J.; GUO, W.Q.; SHI, D.C. 2010. Seed germination, seedling survival, and physiological response of sunflowers under saline and alkaline conditions. Photosynthetica 48(1), 278–286.

- LIU, Y.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; CUI, J.; CHEN, G.; XIE, B.; WU, C.; LIU, H. 2014. Synergistic and antagonistic effects of salinity and pH on germination in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *PLoS One* 9(1), 1–11.
- MA, H.; YANG, H.; LÜ, X.; PAN, Y.; WU, H.; LIANG, Z.; OOI, M.K.J. 2015. Does high pH give a reliable assessment of the effect of alkaline soil on seed germination- A case study with *Leymus chinensis* (Poaceae). *Plant Soil* 394(1-2), 35–43. (Disponible: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11104-015-2487-4.pdf> verificado: 19 de julio de 2016).
- MARTÍN, B.; SOSA, O.; MAGRA, G.; ZERPA, G.; BESSON, P. 2012. Emergencia de forrajeras en un suelo salino-alcálico tratado con yeso. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 32(2), 157–164.
- MIACZYNSKI, C.R.O. 1995. Los suelos hidromórficos e hidrohálomórficos de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Fac. Agron.* 15(1), 23–36.
- OTONDO, J.; PESQUEIRA, J.; MARKÁN, E.D.; GARCÍA, M.D. 2014. Implantación de *Panicum coloratum* y *Chloris gayana* en suelos bajos salinos-alcálicos. Resúmenes de la Tercera Reunión de La Red Argentina de Salinidad. 65 p.
- PESQUEIRA, J.; OTONDO, J.; GARCÍA, M.D. 2015. Biomass production and forage quality of *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* in alkaline (pH \geq 9.5) low lands of the Salado river basin. 5th International Symposium of Forage Breeding. (Disponible: <http://www.agro.uba.ar/ISFB2015> verificado: 29 de octubre de 2015).
- PESQUEIRA, J.; HUARTE, H.R.; GARCÍA, M.D. 2016. Producción de biomasa y respuesta a la fertilización de especies forrajeras subtropicales cultivadas en La Pampa deprimida bonaerense. *Rev. Investig. Agropecu.* 42(1), 79–86.
- PETRUZZI, H.; STRITZLER, N. 2003. Mijo perenne - *Panicum coloratum*. EEA Anguil INTA. 1–28.
- PONSENS, J.; HANSON, J.; SCHELLBERG, J.; MOESELER, B.M. 2010. Characterization of phenotypic diversity, yield and response to drought stress in a collection of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) accessions. *F. Crop. Res.* 118(1), 57–72.
- SINGH, R.K.; MISHRA, B.; CHAUHAN, M.S.; YEO, A.R.; FLOWERS, S.A.; FLOWERS, T.J. 2002. Solution culture for screening rice varieties for sodicity tolerance. *J. Agric. Sci.* 139, 327–333.
- SINGH, U.; PRASAD, S.; KUMAR, A.; YADAV, R.K.; SINGH, R.P.; YADAV, G. 2014. Alkalinity induced changes in some of the enzymes of nitrogen metabolism during germination and early seedling growth of rice genotypes. *African J. Agric. Res.* 9(19), 1480–1483.
- TIMSON, J. 1965. New method of recording germination data. *Nature* 207(4993), 216–217.
- VOIGT, P.W.; TISCHLER, C.R. 1997. Effect of seed treatment on germination and emergence of 3 warm-season grasses. *J. Range Manag.* 50(2), 170–174.
- WICKE, B.; SMEETS, E.; DORNBERG, V.; VASHEV, B.; GAISSER, T.; TURKENBURG, W.; FAAIJ, A. 2011. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy Environ. Sci.* 4(8), 2669–2681.
- YOUNG, J.A.; EVANS, R.A. 1981. Germination of Great Basin wildrye seeds collected from native stands. *Agron. J.* 73(6), 917–920.
- ZHANG, Q.; RUE, K. 2014. Alkalinity showed limited effect on turfgrass germination under low to moderate salinity. *HortScience* 49(9), 1201–1204.
- ZHAO, Y.; LU, Z.; HE, L. 2014. Effects of saline-alkaline stress on seed germination and seedling growth of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173(7), 1680–1691.

Pérdida de forraje ocasionada por diferentes densidades de *Dichroplus maculipennis* (Acrididae: Melanoplinae) en una pastura de *Festuca arundinacea* Schreb

MARIOTTINI, Y.^{1,2}; DE WYSIECKI, M.L.^{1,3}; LANGE, C.E.^{1,4}

RESUMEN

Dichroplus maculipennis es una de las especies de tucura más característica y perjudicial de Argentina, principalmente en zonas de la región pampeana y la Patagonia. En años de explosiones poblacionales esta especie ocasiona importantes daños en pastizales naturales, pasturas implantadas y en diversos cultivos. Considerando esto, el objetivo principal de este estudio fue estimar la pérdida de forraje ocasionada por diferentes densidades de *D. maculipennis* en el estado adulto, sobre una pastura de valor forrajero como *Festuca arundinacea*, en condiciones de campo.

La experiencia se realizó en un campo del partido de Tandil, durante el mes de enero de 2016. Se utilizaron jaulas donde se colocaron individuos adultos de *D. maculipennis* en una proporción 1:1 de machos y hembras. Se estimó la pérdida de forraje ocasionada por tres densidades diferentes: 8 ind/m², 16 ind/m² y 32 ind/m². Se realizaron tres réplicas por densidad ensayada y también se establecieron tres jaulas sin tucuras como control.

La biomasa cosechada al final de la experiencia en las jaulas control fue 337,8 ± 7,5 g/m², en las jaulas con una densidad de 8 ind/m² fue de 262,9 ± 11,8 g/m², en aquellas con 16 ind/m² fue de 227,6 ± 6 g/m² y en las jaulas con 32 ind/m² fue de 154,6 ± 9,9 g/m². Las tres densidades utilizadas ocasionaron una disminución significativa en la biomasa de *F. arundinacea* respecto del control ($p < 0,0001$). Asimismo, la biomasa vegetal cosechada en las jaulas con la mayor densidad de tucuras fue significativamente menor a la obtenida en las jaulas con las otras dos densidades ($p < 0,05$). En promedio un individuo por día ocasionó una pérdida de forraje de 0,236 ± 0,02 g.

A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que 8 ind/m² producirían una pérdida de forraje de 749 kg/ha. Con 16 ind/m² la pérdida sería de 1107,4 kg/ha y con 32 ind/m² la pérdida sería de 1873 kg/ha. Esta última densidad ocasionaría una disminución del 55% de la biomasa de la pastura en el lapso de un mes.

Palabras clave: tucura plaga, Melanoplinae, pérdida de forraje, pasturas, densidad, región pampeana.

¹Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), CCT La Plata-CONICET-UNLP, La Plata, Argentina.
Correo electrónico: ymariottini@hotmail.com

²Instituto Multidisciplinario de Ecosistemas y Desarrollo Sustentable (UNICEN), Tandil, Argentina.

³Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP), La Plata, Argentina.
Correo electrónico: mlw@cepave.edu.ar

⁴Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: carlosl@cepave.edu.ar

ABSTRACT

The grasshopper *Dichroplus maculipennis* is considered one of the most characteristic and damaging species of Argentina, mainly in areas of Pampas and Patagonia regions. In outbreak years, this species causes serious damage to grasslands as well as to implanted pastures and various crops. Considering this, the main goal of this study was to estimate the loss of forage caused by different densities of *D. maculipennis* in adulthood on a pasture of forage value as *Festuca arundinacea*, under field conditions.

The experience was conducted in a field of Tandil County, during January 2016. Adult individuals of *D. maculipennis* were placed in cages in a sex ratio 1:1. Forage loss caused by three different densities was estimated with 8 ind/m², 16 ind/m² and 32 ind/m². Three replicates were performed for each assayed density; also three cages were established without grasshoppers as control. The harvested biomass at the end of the experiment in control cages was 337,8 ± 7,5 g/m², in cages with a density of 8 ind/m² was 262,9 ± 11,8 g/m², those with 16 ind / m² was 227,6 ± 6 g / m² and in cages with 32 ind/m² was 154,6 ± 9,9 g/m². The three densities caused a significant decrease in the biomass of *F. arundinacea* respect to the control ($p < 0,0001$). Plant biomass harvested from cages with the highest density of grasshoppers was significantly lower than that obtained from cages with the other two densities ($p < 0,05$). One insect per day caused a forage loss of 0,02 ± 0,236 g/m², on average.

From the results, it can be inferred that a density of 8 ind/m² would produce a forage loss of 749 kg/ha, 16 ind/m² would produce a forage loss of 1107,4 kg/ha, and with 32 ind/m² the loss would be 1873 kg/ha. The latter would cause a decrease of 55% of the biomass of pasture in one month.

Keywords: grasshopper pest, Melanoplinae, forage loss, pastures, Pampas region.

INTRODUCCIÓN

Las tucuras se encuentran entre los principales consumidores primarios de la vegetación en los pastizales (Hewitt y Onsager, 1983; O'Neill *et al.*, 2003) y han desarrollado diversas estrategias para particionar el recurso alimentario (Gangwere *et al.*, 1989), incluyendo la escasa superposición de los ciclos de vida, la preferencia de microhábitats, la especialización en las dietas, la periodicidad en la alimentación y la utilización temporal del recurso alimentario (Lockwood *et al.*, 1996). En muchas situaciones son considerados insectos perjudiciales dado que compiten con el ganado por el forraje disponible y también consumen y destruyen diversos cultivos (Hewitt, 1977; De Wysiecki

y Sánchez, 1992; Onsager, 2000; Branson, 2008). A altas densidades pueden destruir plantas enteras o grandes porciones de ellas, produciendo una disminución en la superficie fotosintética, inhibiendo la reproducción vegetativa y disminuyendo las reservas radicales (Hewitt y Onsager, 1983). En diversos estudios se ha estimado la pérdida de forraje ocasionada por diferentes especies de tucuras, determinándose que la cantidad de forraje consumido por los individuos se incrementa con los estados de desarrollo del insecto, siendo en el estado adulto cuando ocasionan la mayor pérdida (Putnam, 1962; Hewitt *et al.*, 1976; Hewitt, 1978; Sánchez y de Wysiecki, 1990; Bulacio *et al.*, 2005; Torrusio *et al.*, 2009; Mariottini *et al.*, 2011a, entre otros).



Figura 1. Individuos adultos de *Dichroplus maculipennis* en plantas de soja. Diciembre de 2009, Benito Juárez, provincia de Buenos Aires.



Figura 2. Individuos adultos de *Dichroplus maculipennis* en plantas de Maíz. Diciembre de 2009, Benito Juárez, provincia de Buenos Aires.

Además, estas investigaciones permiten tener una aproximación de las pérdidas económicas y de la disminución de la productividad de un pastizal (De Wysiecki y Sánchez., 1992; Onsager, 2000; Branson *et al.*, 2006).

Dichroplus maculipennis es una de las especies de tucuras más perjudiciales de Argentina, principalmente en zonas de la región pampeana y la Patagonia (Cigliano *et al.*, 1995; Lange *et al.*, 2005; Mariottini *et al.*, 2012). En nuestro país se distribuye en un triángulo que se extiende desde Buenos Aires y Entre Ríos hasta el sur de San Juan, en el norte, y hasta Santa Cruz en la Patagonia (COPR, 1982; Carbonell *et al.*, 2006). Es una especie polífaga con diapausa embrionaria obligatoria (Mariottini *et al.*, 2011a,b). La última explosión poblacional (“outbreak”) de esta especie registrada en la región pampeana comenzó a fines de 2008 y se mantuvo hasta 2010, abarcando una superficie aproximada de 2.500.000 hectáreas en el centro y sur de la provincia de Buenos Aires. En algunos sitios, la densidad de *D. maculipennis* alcanzó 75 ind/m², fenómeno que ocasionó importantes daños en pastizales naturales, pasturas implantadas y en diversos cultivos (maíz, soja, girasol, alfalfa, cebada, sorgo, entre otros) determinando pérdidas económicas de gran magnitud para productores agrícolas y ganaderos de la zona (Mariottini *et al.*, 2012) (figuras 1 y 2).

La pérdida de forraje debido a la acción de las tucuras es función de una variedad de factores entre los que se destacan: las especies involucradas, la densidad de sus poblaciones, las tasas de consumo y el promedio de longevidad de los individuos (Hewitt y Onsager, 1983). La estimación de la pérdida de forraje que ocasiona una determinada especie de tucura constituye un dato esencial a la hora de decidir acerca de la necesidad o la justificación de implementar alguna medida de control de estos insectos (Wewetzer *et al.*, 1993).

Festuca arundinacea es la gramínea forrajera perenne más importante de las pasturas cultivadas de la región central y sur de la Argentina. Las pasturas perennes que incluyen *F. arundinacea* son utilizadas para la producción sostenible de carne y leche y están ampliamente distribuidas en toda la región pampeana (Miñón, 2013).

Considerando el valor forrajero de esta gramínea, el objetivo de este estudio fue evaluar la pérdida de forraje

ocasionada por diferentes densidades de *D. maculipennis* en el estado adulto, en una pastura de *F. arundinacea*, en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un campo ubicado en el partido de Tandil (37°12' 27.39"S, 59° 17' 22.53"O), sobre una pastura de *Festuca arundinacea*, que al momento de comenzar el estudio se encontraba en estado de floración, con una altura promedio de las plantas entre 25 y 30 cm. Esta especie tiene crecimiento otoño-invierno-primaveral y se encuentra adaptada a diferentes tipos de suelos, aun a aquellos con limitaciones para el crecimiento de otras especies templadas (Insua *et al.*, 2013; Bazzigalupi y Bertin, 2014). La experiencia se llevó a cabo durante un mes, desde el 5 de enero hasta el 5 de febrero de 2016. Se obtuvieron los datos pluviométricos y de temperatura para la zona de estudio. Por un lado, en enero de 2016 las precipitaciones en la zona fueron de 184,52 mm, el doble del valor promedio para este mes, que es de 91 mm. Por otro lado, la temperatura también fue mayor, la temperatura promedio en enero del corriente año fue de 20,9 °C con una mínima promedio de 13,9 °C y una máxima promedio de 29,3 °C, la temperatura promedio para la zona durante este mes fue 20,8 °C, con una mínima promedio de 12,8 °C y una máxima promedio de 28,9 °C (<http://www7.nccd.noaa.gov/>).

Con el objetivo de estimar la pérdida de forraje (consumo + tasa de destrucción) ocasionada por diferentes densidades de *D. maculipennis* se instalaron en el sitio de estudio 12 jaulas de aluminio y alambre tejido de 50 cm x 50 cm x 70 cm de alto (0,25 m²) siguiendo la metodología de estudios a campo descripta por Wewetzer *et al.* (1993) (figura 3). Dentro de cada una de las jaulas se colocaron individuos machos y hembras recién mudados a adultos, en una relación 1:1 (Torrusio *et al.*, 2009). Se utilizaron 3 densidades diferentes: 8 ind/m², 16 ind/m² y 32 ind/m². Proporcionalmente, en cada jaula se colocaron 2, 4 y 8 individuos. Se realizaron tres réplicas por densidad ensayada, y también se establecieron 3 jaulas sin tucuras (0 ind/m²) como control.

El ensayo fue controlado diariamente para asegurar la presencia de todos los individuos en cada una de las jau-



Figura 3. Jaulas de aluminio utilizadas en la experiencia.

las. Para estimar la biomasa vegetal inicial de la pastura se tomaron 5 muestras cosechando la vegetación presente en 0,25 m².

Finalizada la experiencia, se cosechó la biomasa vegetal presente en cada una de las jaulas. Todo el material cosechado se llevó a laboratorio para su procesamiento y se secó en estufa a 70 °C hasta peso constante, posteriormente se pesó en balanza de precisión de 0,001 g. La pérdida de forraje se estimó considerando la biomasa vegetal final cosechada en las jaulas con tucuras respecto a las jaulas control. Se realizó un análisis de la varianza unifactorial (ANOVA) para comparar la biomasa final colectada dentro de cada una de las jaulas con diferentes densidades (tratamientos) y las jaulas control, posteriormente se aplicó el test de Dun-

can. También se comparó la biomasa final en relación con la biomasa inicial de la pastura en las jaulas control y en las jaulas con las diferentes densidades, en cada uno de los casos se aplicó un test de T con la corrección de Satterwait. Se utilizó el software InfoStat versión 2014.

La pérdida de forraje realizada por individuo se estimó dividiendo la pérdida de forraje ocurrida en cada una de las jaulas por el número de individuos presentes, posteriormente se realizó un promedio. Los valores obtenidos de pérdida de forraje para cada una de las densidades ensayadas indicados en gramos/m² también se expresaron en kg/ha.

RESULTADOS

La biomasa de *F. arundinacea* cosechada al inicio del estudio fue de 68, 21 ± 5,5 g/m², y la cosechada al final de este fue, en las jaulas sin tucuras (control) de 337,8 ± 7,5 g/m², y en las jaulas con tucuras de 262,9 ± 11,8 g/m² para una densidad de 8 ind/m², de 227,6 ± 6 g/m² en las jaulas con 16 ind/m² y de 154,6 ± 9,9 g/m² en las jaulas con 32 ind/m². Comparando estos valores, se registró un aumento significativo (T-test p<0,0001), entre la biomasa inicial y la obtenida al final de la experiencia, tanto en las jaulas control como en las jaulas con presencia de tucuras.

La diferencia observada en los valores de biomasa final de *F. arundinacea* entre el control y las jaulas con tucuras (figura 4) fue significativa (tabla 1). Las tres densidades de *D. maculipennis* ensayadas disminuyeron significativamente la biomasa de *F. arundinacea* con respecto al tratamiento control (Duncan p<0,05). La biomasa vegetal en las jaulas con la mayor densidad de tucuras fue significativamente menor a la de las jaulas con las otras dos densidades (Duncan p<0,05). Si bien la biomasa final de *F. arundinacea* en

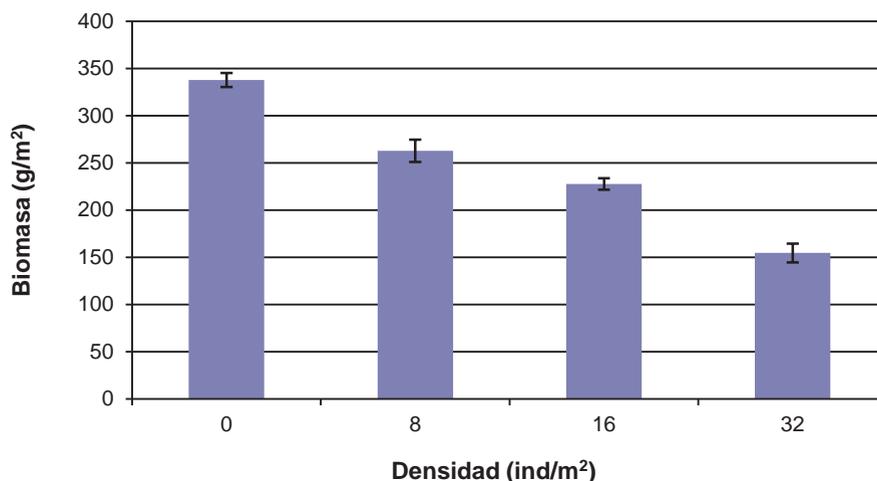


Figura 4. Valor promedio (± ES) de la biomasa final de *Festuca arundinacea* (g/m²) en las jaulas control (sin tucuras) y en las jaulas con las tres densidades de *Dichroplus maculipennis* ensayadas.

las jaulas con una densidad de 16 ind/m² fue menor a la registrada para una densidad de 8 ind/m², esta diferencia no fue significativa. La pérdida de forraje ocasionada por 8 ind/m² fue de 74,9 ± 9,63 g/m², por 16 ind/m² fue de 110,2 ± 4,93 g/m² y por 32 ind/m² de 183,16 ± 8,09 g/m². En promedio un individuo por día ocasionó una pérdida de forraje de 0,236 ± 0,02 g.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta experiencia la pastura dentro de las jaulas control (sin tucuras) aumentó aproximadamente cinco veces su biomasa. Este incremento significativo fue en parte debido a la ausencia de tucuras ya que la biomasa de *F. arundinacea* aumentó dos veces en las jaulas con una densidad de 32 ind/m², y también por las condiciones hídricas y de temperatura favorables ocurridas durante el mes en el que se llevó adelante la experiencia.

Diversas especies de plantas tienen la capacidad de compensar la herbivoría a través de un aumento en su productividad, lo cual depende de varios factores, entre los que se destacan la condición de la planta, la disponibilidad de nutrientes y agua y la frecuencia e intensidad de la herbivoría (McNaughton, 1983; Scowalter, 2011). Esta situación podría explicar la ausencia de una diferencia significativa entre la biomasa final cosechada en las jaulas con 8 ind/m² y la cosechada en las jaulas con densidad de 16 ind/m². Thompson y Garner (1996) estimaron que *Aulocara ellioti*, una de las especies de tucuras más perjudiciales en pastizales de EE. UU., no disminuye significativamente la biomasa vegetal de *Bouteloua gracilis* cuando el consumo se realiza en primavera, a comienzos de la estación de crecimiento, mientras que sí provoca una disminución en la biomasa vegetal de esta especie cuando el consumo se realiza más avanzada la estación de crecimiento. Belovsky (2000) estudió durante seis años el consumo realizado por una comunidad de tucuras sobre pastizales naturales en Montana (EE. UU.) y estimó que una comunidad de tucuras con una densidad de 21,5 ind/m² produjo un incremento en la productividad primaria del sistema entre un 19,6% a un 20,9%, bajo condiciones climáticas favorables para el crecimiento de la vegetación. Sin embargo, a partir de densidades superiores a los 37,4 ind/m² la productividad primaria del sistema disminuyó. Asimismo, el autor señaló que estas estimaciones cambiaron con las precipitaciones debido a que en condiciones de sequía disminuyó la pro-

ductividad primaria del pastizal. En este sentido, si el cultivo o la pastura se encuentran en una situación de estrés debido a un déficit hídrico, el daño ocasionado por una alta densidad de tucuras puede intensificarse. Gage y Mukerji (1978) indicaron que el daño ocasionado puede ser aún mayor si existe simultaneidad entre el nacimiento de las tucuras y la emergencia de la vegetación.

La pérdida de forraje ocasionada por las tucuras incluye el forraje consumido y el material que dejan caer cuando se alimentan (Hewitt, 1978; Sánchez y De Wysiecki, 1990; Mariottini et al., 2011a). Experiencias llevadas a cabo en bioferio bajo condiciones controladas (temperatura: 30 °C; fotoperíodo: 14L: 10O) evidenciaron que *D. maculipennis* es una especie que dejó caer material al alimentarse y que la pérdida de forraje aumentó desde el VI estadio hasta el adulto reproductivo, representando el material que dejan caer al alimentarse, en promedio, 1,71% (Mariottini et al., 2011a). Sánchez y De Wysiecki (1990), en un estudio realizado en condiciones semicontroladas en un pastizal de La Pampa con *Dichroplus pratensis*, estimaron que un 30% de la pérdida de forraje ocasionada correspondía al material que las tucuras dejaban caer al alimentarse.

Trabajos realizados en nuestro país con otras especies de tucuras consideradas plagas del agro como *Dichroplus elongatus*, *D. pratensis*, *Aleuas linneatus* y *Rammathocerus pictus* (Sánchez y de Wysiecki, 1990; Bulacio et al., 2005; Genovesio et al., 2011) aportaron información valiosa sobre la pérdida de forraje por diferentes estadios de desarrollo de cada una de estas especies en diversos tipos de vegetación (tabla 2).

Comparando los resultados de este estudio con los obtenidos bajo condiciones controladas (temperatura: 30 °C fotoperíodo: 14L: 10O) (Mariottini et al., 2011a), para *D. maculipennis*, la pérdida de forraje promedio por individuo resultó ser superior a la registrada para los mismos estadios de desarrollo bajo condiciones controladas, donde la pérdida de forraje promedio fue de 0,029 ± 0,0064 g/día (tabla 2). Igual situación ocurre con *D. elongatus*, ya que los resultados obtenidos por Bulacio et al. (2005) y Genovesio et al. (2011) sobre la pérdida de forraje ocasionada por ninfas y adultos de esta especie en condiciones semicontroladas son mayores a los valores de consumo estimados por Mariottini et al. (2011) en laboratorio en condiciones controladas (tabla 2). Misra y Putnan (1966) registraron la misma tendencia al comparar el consumo en laboratorio y en cam-

	Sumatoria de los cuadrados		g.l	Media cuadrática	F	p-valor
	Tipo I					
Modelo	51445,83		3	17148,61	60,18	<0,0001
Densidad	51445,83		3	17148,61	60,18	<0,0001
Error	2279,82		8	284,98		
Total	53725,65		11			

Tabla 1. ANOVA de una vía de las tres densidades de *Dichroplus maculipennis* ensayadas y las jaulas control (sin tucuras).

Acrididae	Estado de desarrollo y sexo	Condiciones de la experiencia	Especie vegetal ofrecida	Pérdida de forraje estimada (g/día)	Daño estimado por densidad	Cita
Melanoplinae						
<i>Dichroplus elongatus</i>	Ninfas y adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Medicago sativa</i> <i>Sorghum bicolor</i>	<i>M. sativa:</i>	Para una población de 10 ind/m ² 1332 kg/ha	Bulacio <i>et al.</i> , 2005
				Ninfas menores: 0,0758		
				Ninfas mayores: 0,138		
				Hembras: 0,262		
				Machos: 0,151		
				<i>S. bicolor:</i>		
				Ninfas menores: 0,0098		
				Ninfas mayores: 0,0215		
				Hembras: 0,0939		
				Machos: 0,0584		
Ninfas y adultos	En bioterio bajo condiciones controladas (30 °C; 14L: 100).	<i>Bromus brevis</i>	Ninfas de IV: 0,0130	-	Mariottini <i>et al.</i> , 2011	
			Ninfas de V: 0,0213			
			Hembras: PR, 0,031; R, 0,019			
			Machos: PR, 0,0204; R, 0,0129			
Adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Zea mays</i> <i>Medicago sativa</i>	<i>M. sativa:</i>	-	Genovesio <i>et al.</i> , 2011	
			Hembras: 0,302			
			Machos: 0,233			
			<i>Z. maíz:</i>			
Hembras: 0,208						
Machos: 0,154						
<i>Dichroplus exilis</i>	Ninfas y adultos	En bioterio bajo condiciones controladas (30 °C; 14L:100).	<i>Bromus brevis</i>	Ninfas de IV: 0,0099	-	Bardi <i>et al.</i> , 2011
				Ninfas de V: 0,0180		
				Hembras: PR, 0,0281; R, 0,0131.		
Machos: PR, 0,0168; R, 0,00771						
	<i>Dichroplus maculipennis</i>	Ninfas y adultos	En bioterio bajo condiciones controladas (30 °C; 14L:100).	<i>Bromus brevis</i>	-	Mariottini <i>et al.</i> , 2011
Ninfas de VI: 0,0342						
Hembras: PR, 0,0487; R, 0,0184.						
Machos: PR, 0,0323; R, 0,0117						
<i>Dichroplus pratensis</i>	Ninfas y adultos	En jaulas en campo, con raciones ofrecidas.	Diferentes especies de gramíneas del pastizal natural	Ninfas de V: 0,0038	Para una población de 22,2 ind/m ² desde IV hasta Adulto se estimó una pérdida de 274,32 kg/ha	Sánchez y De Wysiecki 1990
<i>Melanoplus infantilis</i>	Adultos	Jaulas en campo	<i>Agropyron smithii</i>	Adultos: 0,035	1 ind/m ² 22 kg/ha	Hewitt 1978
Gomphocerinae						

Acrididae	Estado de desarrollo y sexo	Condiciones de la experiencia	Especie vegetal ofrecida	Pérdida de forraje estimada (g/día)	Daño estimado por densidad	Cita
Melanoplinae						
	Ninfas y adultos	Condiciones de campo	<i>Stipa comata</i> Gramíneas sp	Individuo: 0,0345	–	Hewitt <i>et al.</i> , 1976
<i>Aulocara ellioti</i>	Ninfas y adultos	Semicontroladas, se ofrecieron raciones de alimento.	-	Ninfas IV: 0,0179 Ninfas V: 0,0398 Adultos: 0,0609	–	Hewitt 1978
<i>Amblitropidia australis</i>	Adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Medicago sativa</i> <i>Zea mays</i>	<i>M. sativa:</i> Hembras: 0,087 Machos: 0,147 <i>Z. maíz:</i> Hembras: 0,728 Machos: 0,229	–	Genovesio <i>et al.</i> , 2011
<i>Dichromorpha australis</i>	Adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Medicago sativa</i> <i>Zea mays</i>	<i>M. sativa:</i> Hembras: 0,237 Machos: 0,097 <i>Z. maíz:</i> Hembras: 0,401 Machos: 0,217	–	Genovesio <i>et al.</i> , 2011
<i>Orphulella punctata</i>	Ninfas y adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Medicago sativa</i> <i>Sorghum bicolor</i>	<i>M. sativa:</i> Ninfas menores: 0,0627 Ninfas mayores: 0,0920 Hembras: 0,157 Machos: 0,127 <i>S. bicolor:</i> Ninfas menores: 0,0227 Ninfas mayores: 0,0634 Hembras: 0,135 Machos: 0,0761	Para una población de 10 ind/m ² 1184,00 kg/ha	Bulacio <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhammatocerus pictus</i>	Adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Zea mays</i> <i>Medicago sativa</i>	<i>M. sativa</i> Hembras: 0,074 Machos: 0,064 <i>Z. maíz:</i> Hembras: 1,390 Machos: 0,483	–	Genovesio <i>et al.</i> , 2011

Acrididae	Estado de desarrollo y sexo	Condiciones de la experiencia	Especie vegetal ofrecida	Pérdida de forraje estimada (g/día)	Daño estimado por densidad	Cita
Melanoplinae						
Copiocerinae						
<i>Aleuas linneatus</i>	Adultos	Semicontroladas en invernáculo, se ofrecieron raciones de alimento.	<i>Zea mays</i>	M. sativa:	–	Genovesio <i>et al.</i> , 2011
				Hembras: 0,190		
			<i>Medicago sativa</i>	Machos: 0,086		
				Z. maíz		
				Hembras: 0,616		
				Machos: 0,331		
Oedipodinae						
<i>Camnula pellucida</i>	Adultos	Condiciones de campo	<i>Poa pratensis</i>	Adultos: 0,095	1 ind/m ² 11,47 kg/ha	Putnam 1962

Tabla 2. Estimación del consumo y pérdida de forraje realizada por diferentes especies de tucuras en condiciones de campo y de laboratorio. PR: individuos en estado prereproductivo, r: individuos en estado reproductivo, ninfas menores: Estadios I-II y III, ninfas mayores: estadios IV-V.

po de *Camnula pellucida*, estimando una pérdida diaria de 0,0387 g por adulto en condiciones de laboratorio y 0,0961 g por adulto en condiciones de campo. En relación con esto, Chapman *et al.* (1990) señalan que en las tucuras los requerimientos nutricionales en cantidad y calidad del alimento varían según distintos factores entre los que mencionan: el estado de desarrollo, el estatus reproductivo y el comportamiento del insecto.

Como fuera mencionado en la introducción, la densidad de las poblaciones, las especies involucradas, las tasas de consumo y el promedio de longevidad de los individuos son factores centrales en la pérdida de forraje generada por la acción de las tucuras (Hewitt y Onsager, 1983). Torrusion *et al.* (2005) realizaron un ensayo de consumo de *D. elongatus* sobre cultivos de soja en el partido de Benito Juárez, provincia de Buenos Aires y determinaron que las dos densidades ensayadas (20 y 40 ind/m²) afectaron significativamente el rendimiento final del cultivo, tanto en la soja de primera como en la de segunda, en siembra directa, así como el número promedio de chauchas y granos por planta. Estudios realizados en un pastizal natural de La Pampa, determinaron que una población de *D. pratensis* con una densidad de 22 tucuras/m², removió 274,32 kg/ha de la biomasa vegetal, lo cual representó el 4,8% de la productividad primaria aérea (de Wysiecki y Sánchez, 1992). Bulacio *et al.* (2005) estimaron pérdidas en rendimiento de 1002 kg/ha de alfalfa y 330 kg/ha para sorgo, considerando una densidad de 10 ind/m² de *D. elongatus* (tabla 2). A partir de los resultados obtenidos en este estudio se puede inferir que 8 ind/m² producirían una pérdida de forraje de 749 kg/ha. Con 16 ind/m² la pérdida sería de 1107,4 kg/ha y con 32 ind/m² la pérdida sería de 1873 kg/ha. Esta última densidad ocasionaría una disminución del 55% de la biomasa de la pastura en el lapso de un mes.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta experiencia, las tres densidades ensayadas afectaron significativamente el rendimiento de la pastura. *Dichroplus maculipennis* es una especie característica de los pastizales en Argentina, principalmente en zonas de la Patagonia y la región pampeana donde sus explosiones poblacionales o “outbreaks” constituyen un fenómeno recurrente, y si bien es una de las tucuras más perjudiciales para el agro, hasta el presente no se disponía de información de la pérdida de forraje ocasionada por esta especie en condiciones de campo. Consideramos que esta información es relevante a la hora de establecer un plan de manejo racional de estos insectos.

BIBLIOGRAFÍA

- BARDI, C.; MARIOTTINI, Y.; DE WYSIECKI, M.L.; LANGE, C.E. 2011. Desarrollo post-embriionario, fecundidad y consumo de alimento de *Dichroplus exilis* (Orthoptera: Acrididae) bajo condiciones controladas. Revista de biología tropical. 59 (4) 1579–1587.
- BAZZIGALUPI, O.; BERTÍN, O.D. 2014. Fertilización nitrogenada en *Festuca arundinacea* (Schreb) para producción de semilla con riego en el norte de Buenos Aires, Argentina. RIA 40 (3): 290–295.
- BELOVSKY, G.E. 2000. Do grasshoppers diminish grassland productivity? A new perspective for control based on conservation. En: LOCKWOOD, J.A.; LATCHININSKY, A.V.; SERGEEV, G. (Eds.). Grasshoppers and Grassland Health: Managing Grasshopper Outbreaks without Risking Environmental Disaster. Kluwer Academic. Boston. 7–29 pp.
- BRANSON, D. H. 2008. Influence of a large late Summer Precipitation Event on Food Limitation and Grasshopper Population

- Dynamics in a Northern Great Plains Grassland. *Environmental Entomology*. 37 (3): 686–695.
- BRANSON, D.H.; JOERN, A.; SWORD, G.A. 2006. Sustainable Management of Insect Herbivores in Grassland Ecosystems: New Perspectives in Grasshopper Control. *Bioscience*. 56 (9): 743–755.
- BULACIO, N.; LUISELLI, S.; SALTO, C. 2005. Cuantificación del daño potencial de *Dichroplus elongatus* y *Orphulella punctata* (Orthoptera: Acrididae) en sorgo y alfalfa. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires*, 25(3): 199–206.
- CARBONELL, C.S.; CIGLIANO, M.M.; LANGE, C.E. 2006. Acridomorph (Orthoptera) Species of Argentina and Uruguay. Publication on Orthopteran Diversity. The "Orthopterists Society" and the Museo de la Plata, Argentina.
- CHAPMAN, R. F. 1990. Food selection. En: CHAPMAN, R.F.; JOERN, A. (Eds.). *Biology of grasshoppers*. Wiley, Nueva York. 39–73 pp.
- CIGLIANO, M.M.; DE WYSIECKI, M.L.; LANGE, C.E. 1995. Disminución de la abundancia de *Dichroplus maculipennis* en comunidades del sudoeste de la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 54 (1-4): 41–42.
- COPR (Centre for Overseas Pest Research). 1982 *The locust and grasshopper agricultural manual*, COPR, Londres. 690 p.
- DE WYSIECKI, M.L.; SÁNCHEZ, N. 1992. Dieta y remoción de forraje de *Dichroplus pratensis* (Orthoptera, Acrididae) en un pastizal de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ecología Austral* 2: 19–27.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar> verificado: 07 de julio de 2016).
- GAGE, S.H.; MUKERJI, M.C. 1978. Crop losses associated with grasshoppers in relation to economics of crop production. *Journal of Economic Entomology*. 71: 487–498.
- GANGWERE, S.K.; MURALIRANGAN, M.C.; MURALIRANGAN, M. 1989. Food selection and feeding in acridoids: a review. *Contributions of the American Entomological Institute*. 25 (5): 1–56.
- GENOVESIO, R.; LUISELLI, S.; SALTO, C. 2011. Ingesta De Adultos De Cinco Especies De Tucuras (Orthoptera: Acrididae) En Condiciones Semicontroladas. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 10 (1-2). 35–43 pp.
- HEWITT, G.B. 1977. Review of forage losses caused by rangeland grasshoppers. USDA. Miscellaneous Publication 1348.
- HEWITT, G.B. 1978. Reduction of a western wheatgrass by the feeding of two rangeland grasshopper, *Aulocara ellioti* and *Melanoplus infantilis*. *Journal of Economic Entomology*. 1(3): 419–421.
- HEWITT, G.B.; BURLINSON, W.; ONSAGER, J. 1976. Forage losses caused by the grasshopper *Aulocara ellioti* on Shortgrass Rangeland. *Journal of Range Management*. 29 (5): 376–380.
- HEWITT, G.B.; ONSAGER, R.J. 1983. Control of grasshopper on rangeland in the United States, a perspective. *Journal of Range Management*. 3(2): 202–207.
- INSUA, J.R.; DI MARCO, O.N.; AGNUSDEI, M.G. 2013. Calidad nutritiva de láminas de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb) en rebrotes de verano y otoño. *RIA*. 37: 267–272.
- LANGE, C.E.; CIGLIANO, M.M.; DE WYSIECKI, M.L. 2005. Los acridoideos de importancia económica en la Argentina. En: BARRIENTOS LOZANO, L.; ALMAGUER, P. (Eds.). *Manejo integrado de la langosta centroamericana y acridoideos plaga en América Latina*. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. 93–135 pp.
- LOCKWOOD, J.A.; ASTRUTTMANN, J.M.; MILLER, C. 1996. Temporal patterns in feeding of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae): importance of nocturnal feeding. *Environmental Entomology*. 25: 570–581.
- MARIOTTINI, Y.; DE WYSIECKI, M.L.; LANGE, C.E. 2011a. Postembryonic development and consumption of the melanoplines *Dichroplus elongatus* Giglio-Tos and *Dichroplus maculipennis* (Blanchard) (Orthoptera: Acrididae: Melanoplineae) under laboratory conditions. *Neotropical Entomology* 40: 190–196.
- MARIOTTINI, Y.; DE WYSIECKI, M.L.; LANGE, C.E. 2011b. Seasonal occurrence of life stages of Grasshopper (Orthoptera: Acridoidea) in the Southern Pampas, Argentina. *Zoological Studies* 50 (6): 737–744.
- MARIOTTINI, Y.; DE WYSIECKI, M.L.; LANGE, C.E. 2012. Variación temporal de la riqueza, composición y densidad de tucuras (Orthoptera: Acridoidea) en pastizales del Sur de la región Pampeana. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 71 (3–4): 275–288.
- MCNAUGHTON, S.J. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos*. 40: 329–336.
- MIÑÓN, D. 2013. Festuca alta. Producción de forraje y carne en los valles regados patagónicos. *Información Técnica N.º 32 año 7 N.º 14*. (Disponible: inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_festuca.pdf verificado: agosto de 2016).
- MISRA, S.D.; PUTNAM, L.G. 1966. The damage potential of the grasshopper, *Camnula pellucida* (Scudd) (Orthoptera: Acrididae) on pastures and ranges in Canada. *Indian Journal Entomology* 28: 224–233.
- NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION (NOAA) NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. NNDC Climate Data Online. 2011. <http://www7.ncdc.noaa.gov/CDO/cdoselect.cmd?datasetabbv=GSD&countryabbv=&georegionabbv> verificado: agosto de 2016.
- O'NEILL, K.M.; OLSON, B.E.; ROLSTON, M.G.; WALLANDER, R.; LARSON, D.P.; SEIBERT, C.E. 2003. Effects of livestock grazing on rangeland grasshopper (Orthoptera: Acrididae) abundance. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 97: 51–64.
- ONSAGER, J.A. 2000. Suppression of Grasshoppers in the Great Plains through grazing management. *Journal of Range Management*. 53: 592–602.
- PUTNAM, L.G. 1962. The damage potential of some grasshoppers on the Native Grassland of British Columbia. *Canadian Journal of Plant Science*. 42: 596–601.
- SÁNCHEZ, N.E.; DE WYSIECKI, M.L. 1990. A quantitative evaluation of feeding activity of the grasshopper *Dichroplus pratensis* Bruner (Orthoptera: Acrididae), in a natural grassland. *Environmental Entomology*. 19 (5): 1392–1395.
- SCHOWALTER, T.D. 2011. *Insect ecology: An ecosystem approach* (3.ª ed.). Elsevier/Academic. San Diego, California.
- THOMPSON, D.V.; GARDNER, K.T. 1996. Importance of grasshopper defoliation period on southwestern blue grama-dominated rangeland. *Journal of Range Management*. 49: 494–498.
- TORRUSIO, S.E.; DE WYSIECKI, M.L.; OTERO, J. 2005. Estimación de daño causado por *Dichroplus elongatus* en cultivos de soja en siembra directa, en la provincia de Buenos Aires. *RIA*. 34: 59–72.
- WEWETZER, A.; KRALL, S.; SCHULZ, F.A. 1993. Methods for the assessment of crop losses due to grasshoppers and locusts. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn*, 54 p.

Tolerancia a las heladas por superenfriamiento en cultivares de nogal (*Juglans regia*) y almendro (*Prunus amygdalus*)

RODRÍGUEZ, A.¹; BENÍTEZ PICCINI, E.¹; MUÑOZ, A.¹

RESUMEN

El nogal y el almendro son cultivados en los valles irrigados de Patagonia norte. El daño por heladas es el estrés ambiental más importante que afecta la productividad de estos cultivos. El período de riesgo por heladas se extiende desde el otoño hasta finales de primavera (abril a octubre). Las plantas pueden evitar el daño por congelamiento al prevenir la formación de hielo extracelular bajando la temperatura de congelamiento (superenfriamiento). Nuestros objetivos fueron: 1) evaluar los cambios en el grado de resistencia antes y durante el invierno en segmentos de tallos de un año de edad de nogales (cv Chandler y Franquette) y 2) determinar los umbrales de superenfriamiento en flores de almendro (cv Guara, Ferragnes y Farraduel). Para el estudio se comparó el análisis térmico y la evaluación del tejido sano después del enfriamiento controlado, basado en el amarronamiento del tejido dañado. Nuestras observaciones y resultados indican que para nogal el grado de tolerancia a las heladas depende de la historia climática previa. Durante fines de verano y otoño el valor de temperatura de nucleación del hielo (TNH) es de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, alcanzando la LT50 a $-7,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100% de daño con temperaturas mínimas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por más de una hora. En pleno reposo invernal la TNH es de $-6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se llega al 25% de daño con temperaturas mínimas de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La desaclimatización inducida disminuye la tolerancia del tejido (TNH de $-5,6$ a $-4,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) y aumenta la variabilidad de respuesta a las bajas temperaturas, con heladas de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ el grado de daño puede ser del 10 al 50% y con $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 25 al 100%. En madera joven de nogal, la concentración de azúcares solubles es el principal indicador y regulador fisiológico de la tolerancia a las heladas. Las flores de almendro tienen un TNH de $-1,7^{\circ}$ a $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La exposición por más de una hora a estas temperaturas provoca la muerte del 45% de los órganos. Si el período prefloración es fresco, el grado de desaclimatización es menor, los valores de TNH disminuyen a $-3,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ otorgándole mayor tolerancia a las heladas.

Palabras clave: desaclimatización, madera de nogal, flores de almendro.

ABSTRACT

Walnuts and almond grown in irrigation valley of Patagonia. The freezing damage is one of the most important environmental stresses that affect productivity. The periods of frost risk is from autumn to late spring (April to October). Plants can avoid freezing damage by preventing extracellular ice formation below the equilibrium freezing temperature (supercooling). The objectives were to: 1) evaluate changes in the degree of hardening

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Alto Valle, Ruta Nacional 22, km 1190, CC782, CPc8332, General Roca, Río Negro, Argentina. Correo electrónico: rodriguez.andrea@inta.gov.ar

before and during winter in walnuts stem segments of one-year-old (cv Chandler y Franquette); 2) determine the threshold for supercooling of almond blossom (cv Guara, Ferragnes y Farraduel). To study were compared thermal analysis and the evaluation of tissue health after controlled freezing, based on tissue browning. Our observations and results indicate that the degree of walnut frost tolerance depends on the previous climate history. During late summer and autumn the value TNH is -5°C , reaching the LT50 to -7.7°C and 100% damage with minimum temperatures of -10°C for more than an hour. In the winter rest TNH is -6.5°C and reaches 25% damage with minimum temperatures of -15°C . The desaclimatización induced decreases tissue tolerance (TNH -4.6°C to -5.6°C) and increases variability in response to low temperatures, with frost -8°C the degree of damage can be from 10 to 50% and -15°C of 25 to 100%. Young walnut wood, the concentration of soluble sugars is the main indicator and physiological regulator of frost tolerance. Almond flowers have TNH of -1.7°C to -2.5°C . Exposure for more than an hour at these temperatures causes the death of 45% of the organs. If the pre-flowering period is fresh, the degree of desaclimation is lower, TNH values decrease -3.8°C giving it greater tolerance to frost.

Keywords: deacclimation, walnut stem, almond flowers.

INTRODUCCIÓN

Producción de nogales y almendros

En la Patagonia argentina el cultivo de nogales (*Juglans regia*) y almendros (*Prunus amygdalus*) se concentra en los valles irrigados de las provincias de Río Negro y Neuquén. Actualmente la superficie plantada de nogales es de 1.580 hectáreas, principalmente desarrollada en Valle Inferior, Valle Medio y Alto Valle (Iannamico, 2009; Iannamico, 2015a). En lo que respecta al cultivo de almendros, existen 230 ha principalmente en Alto Valle. Los dos cultivos se adaptan a las condiciones climáticas de la región (semidesértica), siendo el factor de mayor riesgo las heladas. Para los nogales tienen mayor relevancia las heladas otoñales (marzo-abril) que afectan a plantas jóvenes y a la madera joven de plantas adultas. Las heladas tardías o primaverales (agosto-septiembre-octubre) son más preocupantes para el cultivo de almendro, dado que afectan la floración (Iannamico, 2015b).

Caracterización de heladas

Los valles patagónicos se caracterizan por estar en un clima semidesértico con un período libre de heladas de 180 a 210 días. El período con heladas se extiende desde la primera quincena de abril hasta primera quincena de octubre. La frecuencia anual media de heladas en el valle irrigado de Río Negro es de 67,5 días. El 12% del total de las heladas anuales corresponde a las tardías. Estas, durante los meses de agosto, septiembre y octubre, son mucho menos frecuentes que las invernales y otoñales, pero de mayor interés agronómico dada la mayor susceptibilidad de los

tejidos, afectando flores y frutos en el caso de almendros y el desarrollo de brotes y yemas que portan las flores pistiladas en nogal. Si bien la frecuencia de heladas otoñales es menor al 4% entre marzo y abril, pueden provocar serios daños en tejidos jóvenes que aún no han agostado. La intensidad y duración de las heladas es variable, registrándose temperaturas mínimas absolutas de hasta -13°C en el trimestre invernal y de -8°C en el período primaveral con una durabilidad variable, pero que puede en algunos casos superar 7 horas (Rodríguez y Muñoz, 2006). La duración de un evento de helada contempla el número de horas en que la temperatura del aire está por debajo de los 0°C . Los daños físicos y económicos son muy importantes, disminuyendo notablemente el rendimiento potencial y retardando la entrada en producción de cultivos jóvenes.

Características ecofisiológicas de las especies a las bajas temperaturas

En los vegetales existe más de un mecanismo para tolerar las bajas temperaturas y evitar el daño por congelamiento; pueden sobrevivir a temperaturas de congelamiento evitando o tolerando la formación de hielo extracelular (Levitt, 1978). Los árboles frutales de hoja caduca presentan este tipo de estrategias evitando en un primer momento la formación de hielo extracelular a través del superenfriamiento y posteriormente tolerando ese congelamiento con el inicio del proceso de deshidratación celular (Aslani Aslamarz *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2007; Mathers, 2004). Los umbrales para cada especie y variedad son diferentes y además cada tejido se comporta de manera específica (Proebsting y Mills, 1978; Ashworth y Wisniewski, 1991). El objetivo de

nuestro trabajo es evaluar el comportamiento de la madera joven de nogal a las heladas ante diferentes condiciones fisiológicas de aclimatación y en almendros determinar el punto crítico de daño por temperaturas subcero en el estado de plena floración para distintas variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la simulación de heladas se utilizó un prototipo de enfriamiento controlado (Rodríguez *et al.*, 2012) el cual consiste en módulos termoelectrónicos (celdas peltier 12V-63 watts) para enfriar un recipiente de metal (cámara) aislado térmicamente. El conjunto incluye un disipador de calor y se encuentra alojado dentro de un refrigerador que debe mantenerse a temperatura estable. La precisión de las mediciones fue de $\pm 0,1$ °C, a un valor de temperatura de 0 °C, con un error fijo y por lo tanto compensable, de aproximadamente 0,15 °C. El registro térmico se realizó de forma individual para cada muestra (tallo o flor) con 24 termocuplas tipo T de cobre-costantán de 1 mm de diámetro, instaladas a un data logger DLZe (Delta T Devices). En los tallos se realizó una pequeña perforación lateral para colocar la termocupla y en la flor se colocó dentro del cáliz. La tasa de enfriamiento fue de 2 a 3 °C h⁻¹ desde los 0 °C hasta llegar a la temperatura mínima preestablecida para cada tejido. El almendro (*Prunus amygdalus* L.) se evaluó durante septiembre del año 2011 y 2013 con temperaturas mínimas de -2,7 °C y -4 °C. Las flores de almendro permanecieron por treinta minutos a esa temperatura. En cuanto a la madera de nogal se trabajó con temperaturas mínimas de -5 °C a -15 °C; el lapso de exposición fue de una hora; excepto en las heladas simuladas en julio que tuvieron una duración de 4 horas. Las curvas de enfriamiento fueron expresadas como temperatura en función del tiempo en horas. Las muestras retiradas de la cámara de enfriamiento se dejaron 24 horas a temperatura ambiente (20° a 22 °C) con un 100% de humedad relativa. Después de cada simulación se determinó el daño producido en los tejidos a través de la técnica de observación visual por amarronamiento utilizando una lupa (Nikon 10X/21). Para esto se utilizaron cortes transversales de las muestras de madera. En cuanto a las flores se las observó enteras para identificar muerte total del gineceo y posteriormente se realizó un corte longitudinal de este. La muerte celular puede tener lugar después de una fase de superenfriamiento y posterior formación de cristales de hielo. La temperatura a la cual ocurre el congelamiento del agua es denominada de nucleación del hielo (TNH). Por un lado, esta se observó a través de las curvas de enfriamiento por la ocurrencia de un eventual incremento de la temperatura del tejido debido al exotermo (pérdida de calor por el cambio de estado del agua intercelular). Por otro lado, se determinó en los tejidos el contenido de almidón y azúcares solubles por el método descrito por Southgate (1991); la absorbancia fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro (SP 1105, Spectrum, China). El contenido relativo de agua se determinó por diferencia entre peso seco y húmedo de las muestras. La temperatura letal media (LT50) se determinó

por interpolación a través de una curva de respuesta a diferentes valores de temperatura mínima.

Se trabajó con almendro (*Prunus amygdalus* L.) cultivares Guara, Ferragnes y Farraduel en estado de plena floración. En nogal (*Juglans regia* L.) se evaluó madera joven de un año de edad para las variedades Chandler y Franquette. En este último caso se evaluó material aclimatado (otoño-invierno) y desaclimatado (verano-invierno). En cuanto al material desaclimatado se evaluó el comportamiento de tejido en estado vegetativo (verano, principios de marzo) y tejido aclimatado, por estar en estado de reposo invernal, que fue desaclimatado artificialmente. Para modificar el grado de aclimatación del material en invierno se lo sometió a 120 horas (5 días) a temperaturas de 18 °C. También se evaluó el comportamiento del nogal según su lugar de cultivo, Alto Valle-Allen (AV) y Valle Medio-L. Beltrán (VM), dos zonas ubicadas a 200 km de distancia. Las dos zonas en estudio difieren en el régimen diario de temperaturas, principalmente en los valores de mínimas, y por ende existen diferencias en la acumulación de frío y la acumulación de calor asociada al inicio del ciclo de crecimiento. Las variables climáticas analizadas para el cálculo del índice de desaclimatación en almendros pertenecen al registro de la estación meteorológica de la Estación Experimental Alto Valle del INTA (INTA EEA Alto Valle) (Allen, -39°01 Lat. Sur; -67°66 Long. Oeste; 242 m s.n.m. El diseño del muestreo fue completamente aleatorizado, con un n=12 y 2 repeticiones por temporada de estudio. Los factores evaluados fueron aclimatación, variedad, origen (AV/VM). El material se extrajo sobre un total de 20 árboles adultos, tanto en nogal como en almendro. Para nogal se extrajeron ramas de 30 centímetros de longitud. Los trozos sometidos al tratamiento fueron de tres centímetros de longitud y se obtuvieron de la parte media de cada rama. En el muestreo de verano las ramas se colocaron en recipientes con agua y los de invierno se mantuvieron en lugar fresco a 10 °C. Para el caso de las flores, se extrajeron ramas de 15 centímetros de longitud para llevar las flores desde el campo experimental al laboratorio. Luego se sacaron las flores y se sometieron inmediatamente al experimento de frío. Para el análisis estadístico se realizó una comparación de medias (ANOVA) con un subsecuente test de comparaciones múltiples de Tukey con un umbral de significancia del 5% (P=0,05).

RESULTADOS

Grado de resistencia antes y durante el invierno en segmentos de tallos de nogal de un año de edad

En madera joven de nogal variedades Chandler y Franquette se observó amarronamiento, deshidratación del tejido floemático y ruptura de la médula con temperaturas mínimas superiores a los -20 °C (figura 1). Con una temperatura mínima de -15 °C, las dos variedades en estado aclimatado presentaron, en un 37,5% de las muestras, amarronamiento del tejido. El daño por heladas afectó de un 10 a un 20% de la superficie radial observada.

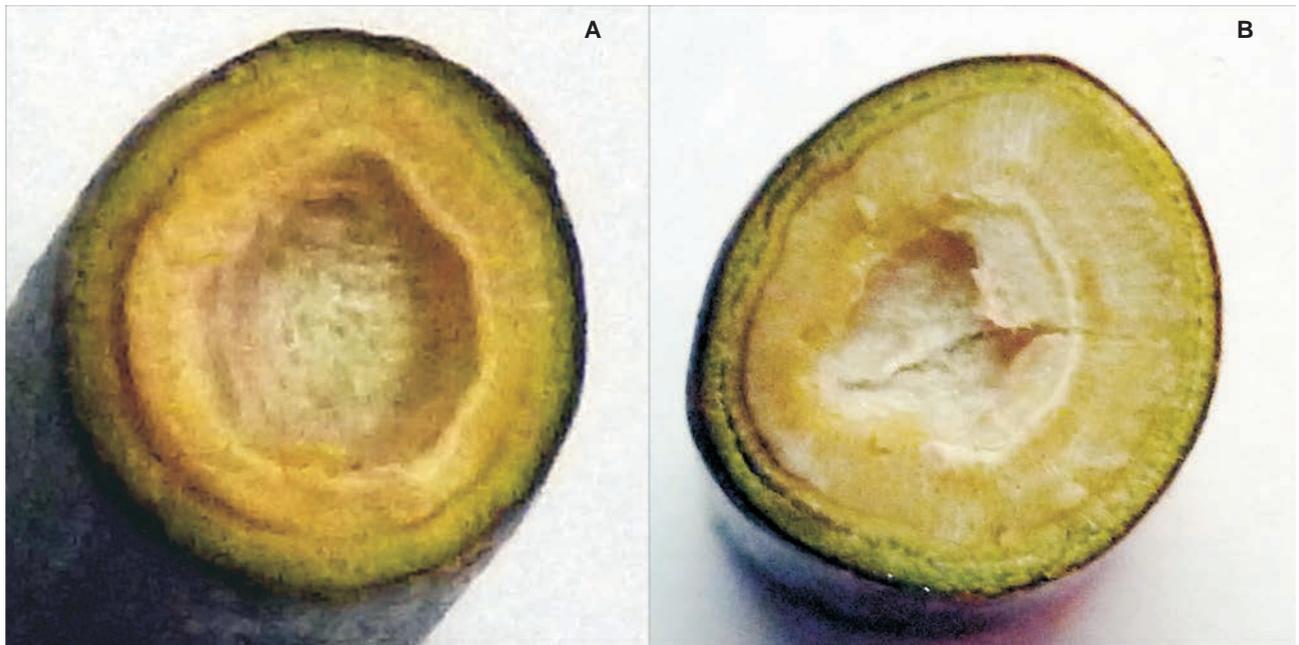


Figura 1. A-daño por helada en madera de nogal Chandler (1 año de edad), B-sección de madera sana.

La desaclimatización en invierno incrementó el daño, afectando del 10 al 50% de la superficie radial con temperaturas mínimas de -8°C . Con temperaturas de -15°C , en Chandler la zona radial analizada fue afectada del 25 al 100% y en Franquette entre 60 y 80%. En estado vegetativo (marzo) Chandler, con temperaturas mínimas de $-7,7^{\circ}\text{C}$ presentó el 50% del tejido necrosado y llegó al 100% de daño con -10°C por más de una hora. Para las dos variedades los valores de TNH obtenidos fueron iguales para marzo y mayo, pero disminuyeron en aproximadamente $1,5^{\circ}\text{C}$ en julio (tabla 1). Estos resultados indican mayor sensibilidad del tejido en la etapa de inicio de reposo invernal.

Como se observa en la tabla 1, no hubo diferencias significativas en el contenido relativo de agua entre marzo y julio. Por lo cual el incremento de mayo se debe a las intensas lluvias ocurridas en el mes de abril (115 a 150 mm). Este mayor contenido hídrico no mostró efecto significativo sobre el valor de TNH. El contenido de azúcares solubles fue variable en los tres momentos medidos, pero entre marzo y julio se observó un incremento del 40% que se corresponde con valores de TNH más bajos (mayor tolerancia). El contenido de almidón no presentó diferencias significativas entre los meses analizados, sin embargo existe una aparente tendencia a la disminución de marzo a julio (tejido desaclimatado y aclimatado respectivamente). Los valores de LT50 (temperatura letal media) variaron en función del grado de desaclimatación en el que se encuentre el tejido (tabla 1 y 2).

La desaclimatación con tan solo 4 días de temperaturas de 18°C produjo un efecto significativo en la madera joven de nogal tanto en la TNH, como en LT50 y el conte-

nido de azúcares solubles (tabla 2). En el material desaclimatado la TNH fue más alta por lo cual su tolerancia al daño fue menor que en el tejido aclimatado. Los valores de TNH en tejido con desaclimatización forzada en julio, no difieren significativamente de los obtenidos en las muestras con desaclimatización natural y plena de marzo; los valores medios fueron de $-4,55\pm 0,43$ y $-5,22\pm 0,38$ respectivamente (test de Tukey $\alpha = 0,05$). Del análisis del mes

	Marzo	Mayo	Julio	p-valor
Azúcares solubles (mg/g)	31,0 a	59,3 c	52,0 b	0,0001
Almidón (mg/g)	12,0 a	8,3 a	8,5 a	0,25
TNH ($^{\circ}\text{C}$)	-5,3 b	-4,8 b	-6,5 a	0,0001
Contenido relativo de agua (%)	45,8 a	48,8 b	44,1 a	0,0001
LT50 ($^{\circ}\text{C}$)	-7,7	< -10	< -15	

Tabla 1. Respuesta de la madera de nogal joven (*Juglans regia* L.) a las heladas simuladas en estado vegetativo (marzo), inicio de reposo invernal (mayo) y pleno reposo invernal (julio).

*TNH: temperatura de nucleación de hielo. LT50: temperatura a la cual muere el 50% de las muestras. Valores medios. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (se lee horizontal), Test de Tukey ($\alpha > 0,05$).

de julio se observó que el porcentaje de daño fue de hasta 30% para la madera en estado aclimatado y de 25 a 100% en el tejido desaclimatado (figura 2). Para las heladas de mayor intensidad el tiempo entre el exotermo y la temperatura mínima fue de 1 a 2 horas mayor que en las de menor intensidad. A modo de ejemplo se incorpora una gráfica de las curvas de descenso térmico y exotermo en madera de nogal (figura 3). La velocidad de descenso térmico fue de 2,5 °C/h (-8 °C) y 3,5 °C/h (-15 °C).

El contenido de azúcares solubles disminuyó al igual que la resistencia al congelamiento (TNH mayor) cuando el tejido está desaclimatado (tabla 2). En cuanto al contenido hídrico del tejido no se observaron diferencias significativas entre el estado aclimatado y desaclimatado.

En estado aclimatado (mayo y julio) las variedades Chandler y Franquette difieren significativamente en TNH. Franquette presentó un menor contenido de agua y valores de TNH más bajos (tabla 3). Esto debería otorgarle mayor capacidad de superenfriamiento y en consecuencia mayor grado de tolerancia a las bajas temperaturas, pero en nuestros ensayos no hemos encontrado diferencias significativas en el grado de daño.

De acuerdo a la zona de la cual provenía el material de estudio, no se observaron diferencias significativas en cuanto al grado de tolerancia a las heladas, pero sí en el contenido de azúcares y almidón, VM presentó mayores concentraciones de almidón y menor contenido de azúcares solubles que AV.

	desaclimatado	aclimatado	p-valor
TNH AV	-5,37+- 0,72b	-6,72+-0,26 a	0,033
TNH VM	-4,77 +- 0,54b	-6,18+-0,23 a	0,008
LT50	-12	Menor a -15	
Az. solubles AV	46,7+-1,79 a	54,0+-1,41 b	0,0077
Az. solubles VM	36,9+-1,23 a	49,5+-1,65 b	0,0001
Almidón AV	8,4+-0,28 a	7,3+-0,79 a	0,45
Almidón VM	13,8+-0,93 a	12,0+-0,80 a	0,22

Tabla 2. Valores de TNH (°C), azúcares solubles (mg/g), almidón (mg/g), LT50 (°C), para tejido aclimatado y desaclimatado (mes de julio) para madera de 1 año de edad de nogales (*Juglans regia* L.) de las zonas de Alto Valle (AV) y Valle Medio (VM).*

*valores medios y error estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (se lee horizontal), Test de Tukey ($\alpha > 0,05$).

Umbrales de superenfriamiento en flores de almendro

En almendro (*Prunus amygdalus* L.) variedad Guara se observó un comportamiento diferencial entre temporadas. Para las heladas de mayor intensidad, -4 °C, en el 2011 se registró un 25% de daño por congelamiento del ovario (figura 6 A) y se alcanzó un TNH de -3,8 °C. En la segunda temporada de estudio, las flores manifestaron exotermos con valores de TNH de -2 °C a -2,5 °C, pero con temperaturas mínimas de -2,7 °C; los daños por congelamiento alcanzaron el 45% de la población muestra. El valor de TNH

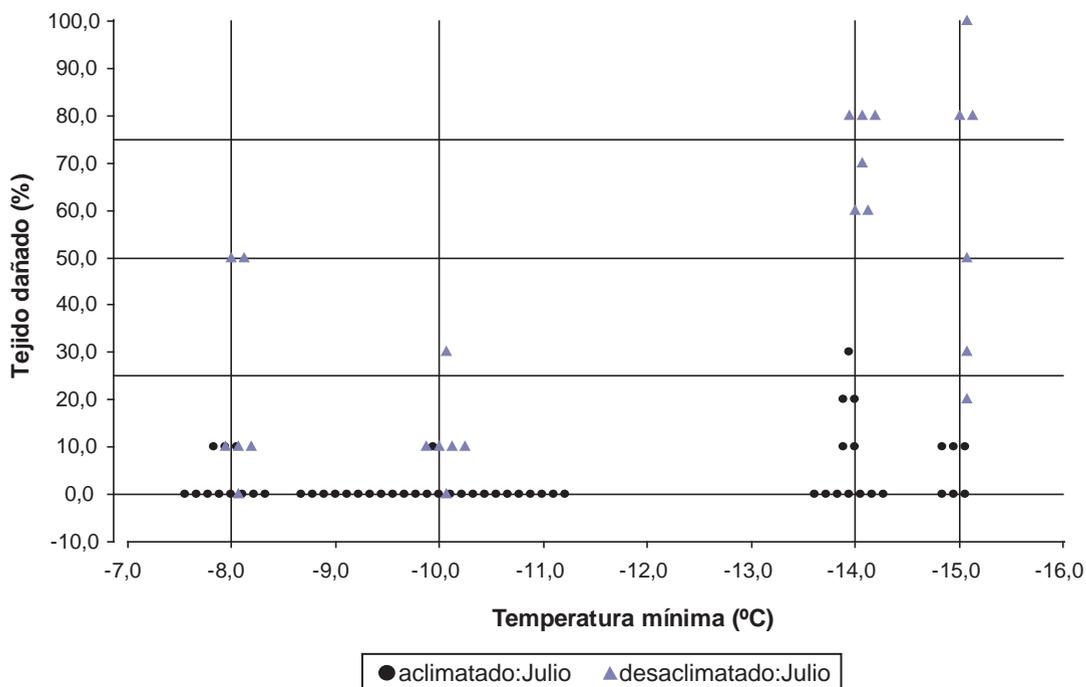


Figura 2. Porcentajes de daño para madera de nogal de 1 año de edad, mes de julio en estado desaclimatado y aclimatado. Rango térmico evaluado -8 °C a -15 °C.

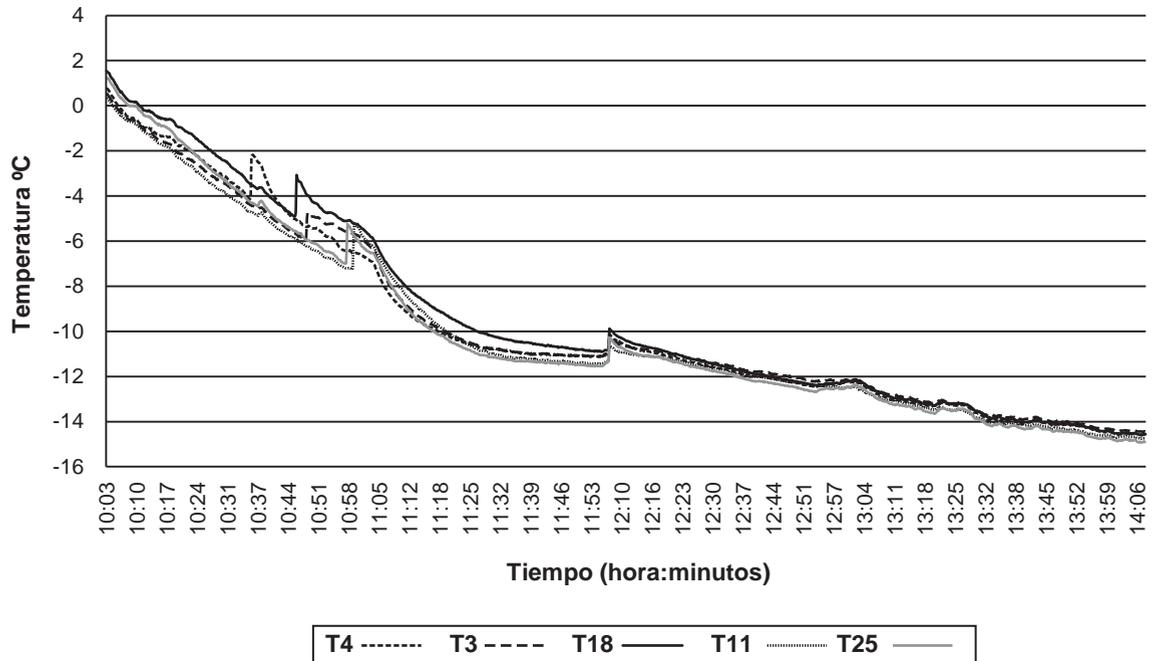


Figura 3. Curvas de enfriamiento en madera de nogal de 1 año de edad, variedad Chandler. Temperatura mínima -15 °C. T4, 3, 18, 11 y 25 son termocupas dentro de trozos madera.

		Chandler	Franquette	p-valor
Desaclimatado	TNH mz	-5,2a	-5,5a	0,61
	TNH j	-4,6a	-5,6a	0,24
	agua mz	46,9b	43,7a	0,0079
	agua j	48,0b	41,7a	0,0080
Aclimatado	TNH m	-4,0b	-5,6a	0,0150
	TNH j	-6,0b	-6,9a	0,0200
	agua m	50,1b	47,4a	0,0240
	agua j	46,7b	42,0a	0,0001

Tabla 3. Comportamiento de las variedades Chandler y Franquette ante heladas simuladas. TNH (°C) y contenido relativo de agua (%) en el tejido aclimatado y desaclimatado, mz: marzo; m: mayo y j: julio.

*valores medios. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (se lee horizontal), Test de Tukey ($\alpha > 0,05$).

fue de 1 a 2 °C más alto un año respecto al otro y el daño se incrementó un 20%. Las temperaturas ambientales previas a las heladas simuladas influyen fuertemente en este comportamiento. Para la comparación se utilizó un índice de desaclimatación para frutales de hoja caduca sujeto a la frecuencia de temperaturas horarias mayores a 16 °C,

4 días previos a la helada (Rodríguez *et al.*, 2014). El grado de desaclimatación al momento de plena floración fue diferente para cada temporada, siendo mayor en el 2013, lo que podría explicar los valores de TNH más altos y el mayor porcentaje de daño en flores de almendro.

Ferraduel y Ferragnes se evaluaron en septiembre del 2013, el día 13 y 20 respectivamente, con heladas de -2,7 y -2,5 °C (figura 7). Los valores de TNH fueron de -1,7 °C con un 45% de daño.

Probabilidad de heladas (%)	Rangos probables de fechas de floración			
	26-31 ago.	1-5 sep.	6-11 sep.	12-18 sep.
Suaves (0° a -1,9 °C)	37,0	37,8	62,0	48,6
Moderadas (-2° a -3,9 °C)	42,0	42,2	20,0	40,0
Fuertes (-4° a -5,9 °C)	13,0	15,5	10,0	8,0
Muy Fuertes (< -6 °C)	7,4	4,4	7,5	2,7
Total (< 0 °C)	30,4	25,6	22,7	21,0

Tabla 4. Peligrosidad de heladas primaverales para Alto Valle durante el período de floración de almendros*, serie 1990-2015.

*fechas medias de inicio y fin de floración de Guara (serie 1978-2014) según Iannamico (2015b).

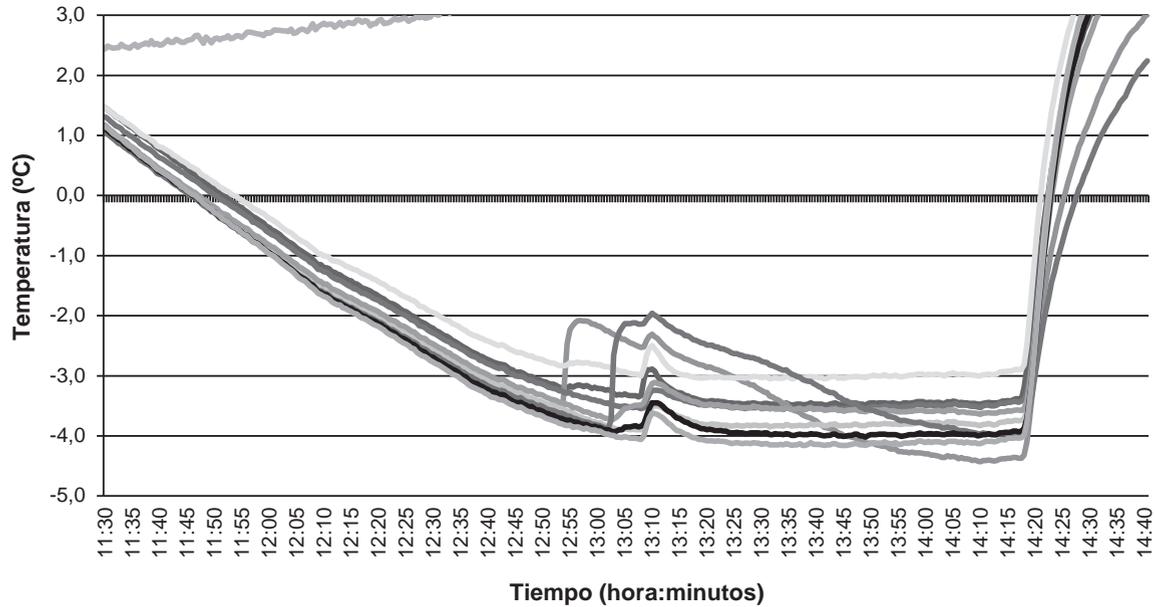


Figura 4. Curva de enfriamiento en flores de almendro (*Prunus amygdalus* L.) cv Guara. Estado de plena floración (12/9/2011).

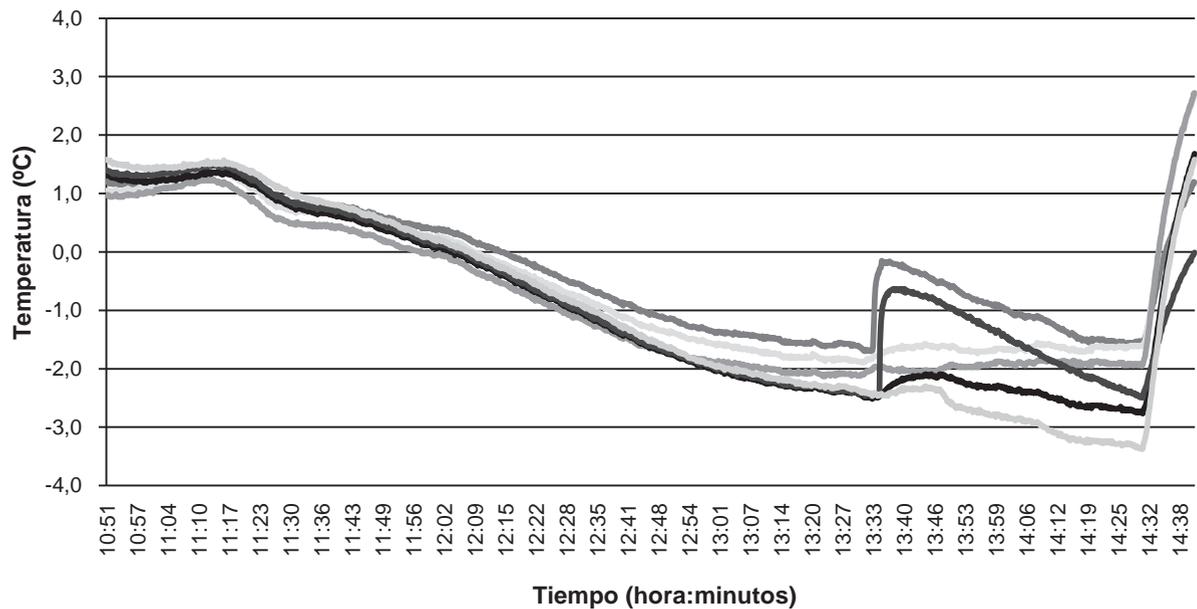


Figura 5. Curva de enfriamiento para almendro (*Prunus amygdalus* L.) cv Guara. Estado de plena floración (13/9/2013), mayor desaclimatación.

Analizando las temperaturas mínimas de 1990 a 2015 se observa que durante el 26 de agosto hasta el 18 de septiembre (período medio de floración de almendros), la probabilidad de ocurrencia de heladas es del 28% y se ha mantenido constante con 7 eventos por año. Si bien, en los últimos 25 años, ha disminuido la frecuencia de heladas fuertes y muy fuertes, la frecuencia de temperaturas de entre -2° y -3,9 °C no ha variado. La peligrosidad de daño es alta para cualquiera de los subperíodos analizados (tabla 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Grado de resistencia antes y durante el invierno en segmentos de tallos de nogal de un año de edad

Definir la temperatura crítica de daño en madera es complejo, la temperatura mínima alcanzada no es un indicador directo de la muerte de madera joven, varios factores influyen en este proceso. Entre ellos está la capacidad de reparar el tejido ante daños parciales, el tiempo transcurrido

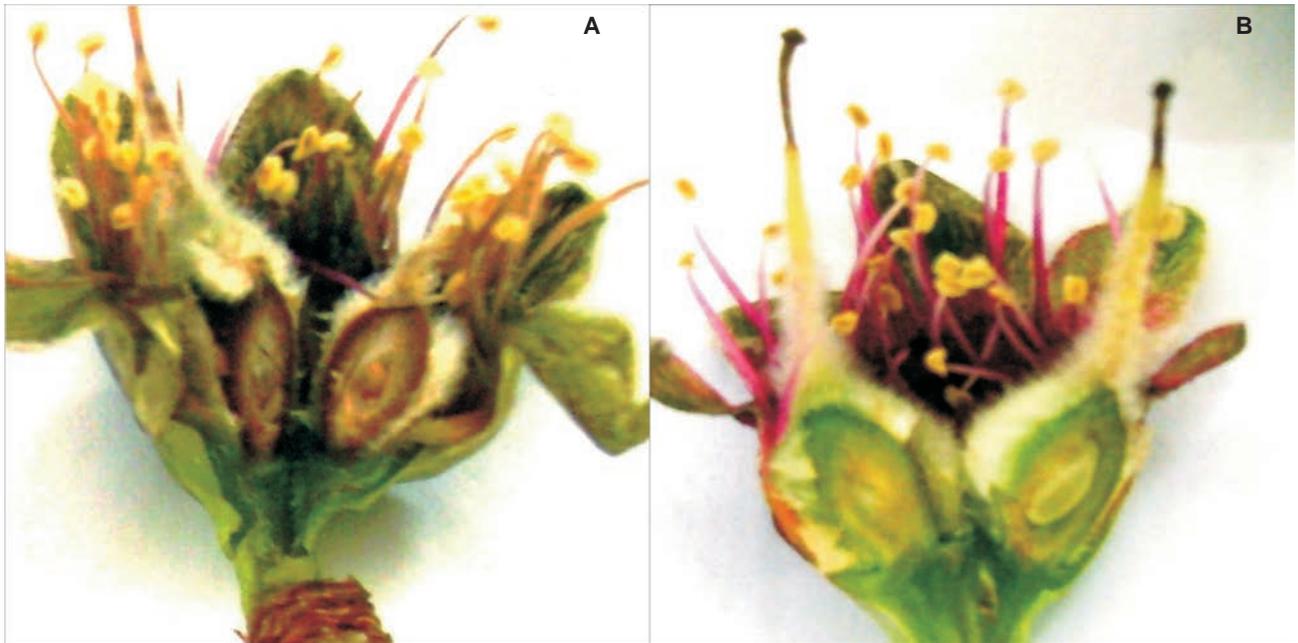


Figura 6. Flor de almendro cv Guara. A. daño total por congelamiento del ovario y estigma; B. ovario sano, sin daño.

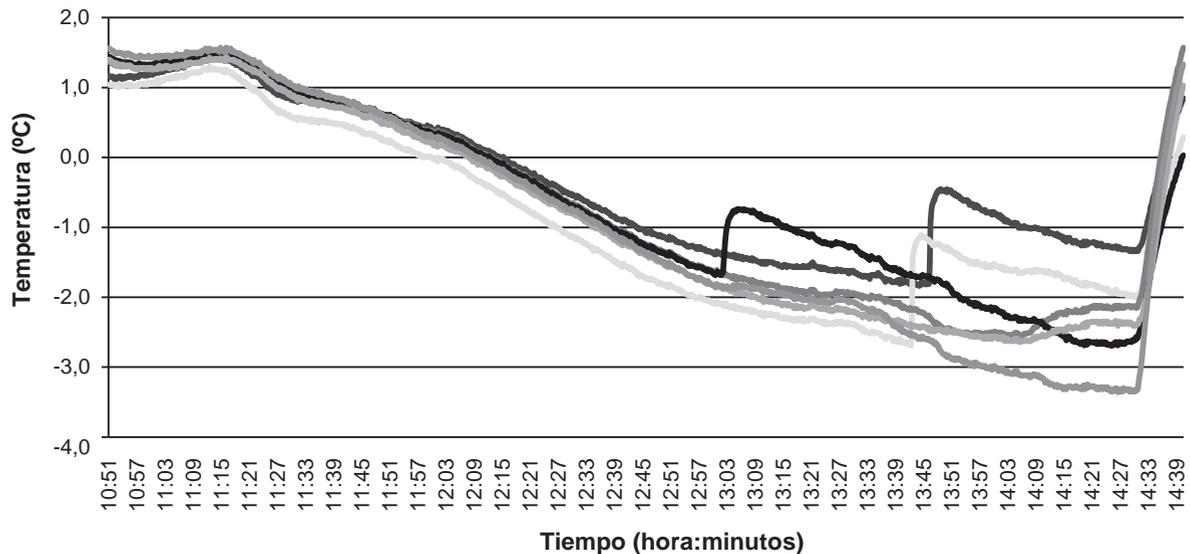


Figura 7. Curva de enfriamiento para almendro (*Prunus amygdalus* L.) cv Ferraduel. Estado de plena floración (13/9/2013).

entre la TNH y el fin de la helada, la diferencia de sensibilidad entre las distintas estructuras de un mismo árbol y el grado de desaclimatización del tejido dependiendo de las temperaturas de los días previos a la helada. Diferentes trabajos sobre congelamiento de tejido leñoso señalan que la concentración de carbohidratos totales se relaciona con la resistencia a las heladas porque regula el ajuste osmótico que previene el congelamiento intracelular (Morin *et al.*, 2007; Poirier *et al.*, 2010; Charrier *et al.*, 2013).

En términos generales, las ramas de un año de edad en nogales tienen de 79-85 mg g⁻¹ de azúcares solubles en invierno y esto se corresponde con LT50 de -21 °C a -24 °C. En nuestros estudios el contenido de azúcares solubles no superó los 54 mg g⁻¹, y con -15 °C se alcanzó 25% de daño en pleno reposo invernal.

Hemos observado que si el tejido permanece menos de 1 hora al valor de TNH, no sufre daño por helada. En mayo

si bien la TNH no difiere estadísticamente con respecto a marzo, el tejido soportó temperaturas más bajas antes de alcanzar un 50% de daño. Durante el otoño hubo menor tolerancia al congelamiento y más variabilidad en la respuesta que en el invierno. Durante el invierno los árboles de hojas caducas utilizan una alta proporción de hidratos de carbono para resistir a las bajas temperaturas, mientras que en otoño y primavera esta relación disminuye porque se destinan también a procesos asociados al crecimiento. Nuestros resultados son similares a los presentados por Aslani Aslamarz *et al.* (2010), en donde las temperaturas exotérmicas en tallos de 1 año de edad para las variedades Pedro y Lara de nogal son de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en mayo, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en julio y en primavera de $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con respecto a los LT50 hemos estimado en Franquette y Chandler valores de $-7,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ para marzo. Estos resultados coinciden con los calculados por Charrier *et al.* (2011) cercanos a los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en junio, hemisferio norte (diciembre, equivalente hemisferio sur) para las mismas variedades.

A mitad del invierno el proceso de aclimatación es completo. Hemos observado en este estudio que con tres días de temperaturas a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, la madera 100% aclimatada perdió tolerancia alcanzando el mismo valor de TNH que el tejido en estado vegetativo. En algunas especies semileñosas se ha comprobado que con 4 días a temperaturas de $17^{\circ}/22\text{ }^{\circ}\text{C}$, la desaclimatización provoca una pérdida de resistencia de hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Pagter *et al.*, 2011).

En nogal la movilización de almidón en invierno genera una acumulación de sucrosa relacionada con la tolerancia a las heladas porque interviene en la reparación de vasos conductores afectados por embolismo provocados por congelamiento (Améglío *et al.*, 2002). Esta podría ser la razón principal por la cual los daños en madera pueden ser parciales o nulos en tejidos en proceso de aclimatación (otoño). Probablemente la madera nueva al estar sometida a una mayor variabilidad metabólica, por el ritmo de crecimiento, responda rápidamente a los cambios en el contenido de azúcares solubles afectando la TNH y grado de tolerancia. Las prácticas de manejo (fertilización, riego, poda, etc.) y climáticas ligadas al proceso fotosintético condicionan el nivel de reservas nutricionales y por ende los procesos asociados al balance total de carbohidratos.

Umbral de superenfriamiento en flores de almendro

Los tejidos florales pierden capacidad de superenfriado al avanzar el desarrollo fenológico y mueren luego de que se inicia la formación de hielo (Ballard *et al.*, 1971; Proebsting y Mills, 1978). Los efectos de las heladas primaverales sobre los órganos reproductivos del almendro son muy variables, se han observado respuestas diferentes entre genotipos, tejidos dentro de una misma planta y entre ciclos productivos (Imani y Khani, 2011). En nuestros estudios observamos que si las flores permanecen por más de 30 minutos a temperaturas iguales a la TNH se produce muerte celular y consecuentemente daño total del ovario. El valor de LT50 depende de cada temporada evaluada al igual que el TNH, sin embargo podemos decir que ante condi-

ciones térmicas propicias para la desaclimatación de los tejidos, las flores de almendro mueren por congelamiento al exponerse por más de treinta minutos a temperaturas subcero de $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menores. En nuestra investigación los datos obtenidos pueden considerarse como los primeros valores referenciales de tolerancia a las bajas temperaturas para el cultivar Guara, y están dentro de los rangos térmicos obtenidos por otros autores en otros cultivares; por ejemplo Imani y Khani, 2011 y Kodad *et al.*, 2010 obtienen en floración 100% de daño con temperaturas mínimas de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la variedad Ferragnes y para Felisia más del 50% de daño con temperaturas de $-2,5^{\circ}\text{C}$, ambas expuestas por el lapso de 1 hora.

AGRADECIMIENTOS

A Celeste Kloster y Fernanda Toscana por acompañarnos durante su pasantía en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- AMÉGLIO, T.; BODET, C.; LACOINTE, A.; COCHARD, H. 2002. Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology*, 22:1211–1220.
- ASLANI ASLAMARZ, A.; VAHDATI, K.; RAHEMI, M. 2010. Supercooling and Cold hardiness of acclimated and deacclimated buds and stems of Persian walnut cultivars and selections. *HortScience* 45(11): 1662–1667.
- BALLARD, J.; PROEBSTING, E.; TUKEY, R.; MIUS, H. 1971. Critical temperatures for blossom buds. *Was. Agr. Ext. Circ. Nos.*, 369–374.
- CHARRIER, G.; BONHOMME, M.; LACOINTE, A.; AMÉGLIO, T. 2011. Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Junglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control? *Int. J. Biometeorol.*, 55: 763–774.
- CHARRIER, G.; POIRIER, M.; BONHOMME, M.; LACOINTE, A.; AMÉGLIO, T. 2013. Frost hardiness in walnut trees (*Junglans regia* L.): How to link physiology and modeling? *Tree Physiology*, 33: 1229–1241.
- IANNAMICO, L. 2009. El cultivo de nogal en clima templado fríos. Primera edición, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. 116 p.
- IANNAMICO, L. 2015a. Cultivo de Nogal. Ediciones INTA.
- IANNAMICO, L. 2015b. Cultivo de Almendro. Ediciones INTA.
- IMANI, A.; KHANI, Y.M. 2011. Characteristics of almond selections in relation to late frost spring. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 2(2): 77–80.
- KODAD, O.; MORALES, F.; SOCIAS, R. 2010. Evaluación de la tolerancia de las flores de almendro a las heladas por fluorescencia de clorofila. *ITEA*, 106 (2): 142–150.
- LEVITT, J. 1978. *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress: An overview of freezing injury and survival, and its interrelationships to other stresses*. Ed. Li P.H and Sakaia. Nueva York, San Francisco, 1: 3–15.
- MATHERS, H.M. 2004. Supercooling and cold hardiness in sour cherry germplasm: Flower buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129(5):675–681.

- MENG, Q.; LLIANG, Y.; WANG, W.; DU, S.; LI, Y.; YANG, J. 2007. Study on supercooling point and freezing point in floral organs of apricot. *Agricultural Sciences in China*, 6 (11): 1330–1335.
- MILLS, L.J.; FERGUSON, J.C.; KELLER, M. 2006. Cold-Hardiness Evaluation of Grapevine buds and Cane Tissues. *Am.J.Enol. Vitic.* 57(2): 194–200.
- MORIN, X.; AMÉGLIO, T.; AHAS, R.; KURZ-BESSON, C.; LANTA, V.; LEBOURGEOIS, F.; MIGLIETTA, F.; CHUINE, I. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27: 817–825.
- PAGTER, M.; HAUSMAN, J.F.; ARORA, R. 2011. Deacclimation kinetics and carbohydrate changes in stem tissues of *Hydrangea* in response to an experimental warm spell. *Plant Science*, 180: 140–148.
- POIRIER, M.; LACOINTE, A.; AMÉGLIO, T. 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. *Tree Physiology* 30, 1555–1569.
- PROEBSTING, E.L.; MILLS, H.H. 1978. Low temperature resistance of developing flower buds of six deciduous fruit species. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 103(2): 192–198.
- RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, A. 2006. Síntesis Agro-meteorológica para el período 1990-2004 EEA Alto Valle. Ed. INTA. Boletín Divulgación Técnica n.º 53, 38 p.
- RODRIGUEZ, A.; BENITEZ PICCINI, E.; MUÑOZ, A. 2012. Desarrollo de un prototipo para determinar temperaturas críticas de daño por heladas en órganos de cultivos frutícolas. XIV Reunión Argentina de Agrometeorología, Malargüe, Mendoza, Argentina.
- RODRÍGUEZ, A.; KLOSTER, C.; BENÍTEZ PICCINI, E.; MUÑOZ, A. 2014. Estimación de un índice de desaclimatación para prever sensibilidad al daño por heladas en frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Reunión Internacional De Agrometeorología Uruguay.
- SOUTHGATE, D.A.T. 1991. Determination of food carbohydrate. Second Edition, Elsevier Applied Science, Nueva York.

Actividad antifúngica de especies del género *Senna* (Caesalpinoideae, Leguminosae) del norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*

DI CIACCIO, L.S.¹; FORTUNATO, R.H.^{2,3}; SALVAT, A.E.^{4,5}

RESUMEN

El género *Senna* comprende alrededor de 360 especies presentándose el 80% en el continente americano. Varias son conocidas por las propiedades antimicrobianas y farmacológicas. Los antecedentes de actividad antifúngica en Argentina fueron reportados en un estudio de extractos metanólicos de hojas de *S. spectabilis* frente a *Fusarium graminearum*. El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antifúngica de 12 extractos metanólicos de distintos órganos de 10 especies del género *Senna*, recolectadas en el norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*, responsable de la podredumbre de la espiga en maíz. Primeramente, todos los extractos fueron evaluados con un ensayo colorimétrico de susceptibilidad. Aquellos que mostraron actividad inhibitoria, luego fueron evaluados mediante bioautografía de contacto, tinción con azul de Evans y azul de anilina, test de crecimiento radial del micelio y por su capacidad para inhibir la producción de fumonisinas. El extracto de frutos de *S. spectabilis* mostró actividad antifúngica con una Concentración Mínima Inhibitoria de 99,9 µg ml⁻¹. Asimismo, se observaron halos de inhibición significativos en la bioautografía de contacto, mientras que en la tinción con azul de Evans y azul de anilina se visualizaron algunas alteraciones en las hifas. En el test de crecimiento radial del micelio, se observó una reducción significativa, y en lo que respecta a la producción de fumonisinas, los extractos provenientes de frutos mostraron una inhibición en su producción de 48,3% mientras que los extractos de flores el porcentaje fue mayor (86,3%). Finalmente, se pudo determinar que *S. spectabilis* presenta actividad antifúngica frente a *F. verticillioides*, confirmando un nuevo registro de bioactividad a esta especie vegetal.

Palabras clave: plantas nativas, antifúngicos, extractos, fumonisinas.

ABSTRACT

The genus *Senna* comprises about 360 species being 80% from the American continent. Several of them are known by their antimicrobial and pharmacological properties. In Argentina antecedents of antifungal activities were reported in studies of methanolic extracts from leaves of *S. spectabilis* against *Fusarium graminearum*. The aim of this work was to analyze the antifungal activity of 12 methanolic extracts of different organs of 10

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Patobiología. CONICET. Nicolas Repetto y de los Reseros s/n, Hurlingham (1686), prov. de Buenos Aires, Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN), Instituto de Recursos Biológicos. CONICET. Nicolas Repetto y de los Reseros s/n, Hurlingham (1686), prov. de Buenos Aires, Argentina.

³Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Moron, Morón, prov. de Buenos Aires, Argentina.

⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Patobiología, Nicolas Repetto y de los Reseros s/n, Hurlingham (1686), prov. de Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: salvat.adriana@inta.gob.ar

species of the genus *Senna* collected from northern Argentina against *Fusarium verticillioides*, causal agent of maize ear rot. At first all the extracts were evaluated to know their antifungal capacity with a colorimetric test. Those which showed inhibitory activity were analyzed by contact bioautography, Evans blue and Aniline blue staining, mycelial radial growth test and also their ability to inhibit fumonisins production. Fruit extract of *S. spectabilis* showed antifungal activity at a Minimum Inhibitory Concentration of $99.9 \mu\text{g ml}^{-1}$. Likewise, in the contact bioautography an inhibition zone was evident, while in Evans blue and aniline blue staining, some alterations in the mycelial hyphae were visualized. In the mycelial radial growth test, a significant reduction was observed, and in the fumonisins production the extracts from fruits showed inhibition of 48.3% while in flowers the percentage was higher (86.3%). Finally, it was determined that *S. spectabilis* has antifungal activity against *F. verticillioides*, giving a new record of bioactivity to this plant species.

Keywords: native plants, antifungal activity, extracts, fumonisins.

INTRODUCCIÓN

En el continente americano se han reportado gran variedad de compuestos químicos con propiedades antibacterianas, antibióticas, antifúngicas y antioxidantes presentes en diferentes especies nativas (Mors *et al.*, 2000; DeFilippis *et al.*, 2004; Viegas Júnior *et al.*, 2006; Lombardo *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2015). El género pantropical y subpantropical *Senna* Mill., conocido por sus diversas propiedades antimicrobianas y farmacológicas (Agarwal y Bajpai, 2010; Jothy *et al.*, 2012; de Albuquerque Melo *et al.*, 2014; Anthony *et al.*, 2014; Lombardo *et al.*, 2015), comprende alrededor de 360 especies, de las cuales más del 80% están distribuidas en América (Irwin y Barneby, 1982; Randell y Barlow, 1998). Argentina, por la extensa superficie que ocupa, posee gran variedad de climas (Cabrera, 1994) que permite la presencia de numerosas especies vegetales con gran potencial de actividad biológica (Ramos *et al.*, 1998; Barquero, 2007) reportándose importantes usos antimicrobianos (Cowan, 1999; Salvat *et al.*, 2004; Serafin *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Coutinho *et al.*, 2008; Silva Júnior *et al.*, 2010). En referencia a la actividad antifúngica del género *Senna*, en la Argentina solo existen registros sobre extractos metanólicos de hojas de *S. spectabilis* frente a una cepa de *Fusarium graminearum* productora de micotoxinas (Salvat, 2010).

En el territorio argentino, una extensa área es destinada al cultivo de maíz. En la campaña 2015/16 se implantaron 3,5 millones de hectáreas obteniendo una producción de 29 millones de toneladas (USDA, 2016). Algunas especies de hongos filamentosos del género *Fusarium* pueden infectar a los cultivos durante su desarrollo en el campo, así como a sus productos durante el almacenamiento. Las pérdidas sufridas en los cultivos asociados a hongos se deben no solo a la reducción del rendimiento y la alteración de la calidad comercial y nutricional, sino también a la producción de micotoxinas, que representan un riesgo para la salud humana y animal (USDA, 2006). *Fusarium* es el género que afecta con mayor frecuencia a los cultivos argentinos, las especies más importantes son: *F. graminearum*, y *F. verticillioides*. (Presello *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2012).

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por *F. verticillioides*, el cual sintetiza las fumonisinas FB_1 , FB_2 , FB_3 (Marasas, 2001), que son responsables de provocar leucoencefalomalacia equina (ELEM) y edema pulmonar porcino (PPE). Además, producen efectos adversos en la función del sistema inmune en pollos, aumentando así la susceptibilidad a microorganismos oportunistas que causan infecciones graves (Voss *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antifúngica de 12 extractos metanólicos de distintos órganos de 10 especies del género *Senna*, recolectadas en el norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*, responsable de la podredumbre de la espiga en maíz y producción de fumonisinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y preparación de los extractos

Los ejemplares de plantas utilizados fueron recolectados del norte de Argentina, identificados taxonómicamente (Fortunato). Ejemplares del material estudiado fueron depositados en el Herbario del Instituto de Recursos Biológicos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (*Herbarium code: BAB* en <http://sciweb.nybg.org/Science2/IndexHerbariorum.asp>). El nombre de las especies, colector, número de espécimen y lugar de recolección se indican en la tabla 1.

El material vegetal fue obtenido dependiendo del estado fenológico de las plantas al momento de su recolección. Cada órgano (ramas, hojas, frutos y flores) fue secado a temperatura ambiente y luego molido finamente con un molino de martillos. Luego, el material vegetal fue extraído con metanol p.a. (MeOH, Merck) a temperatura ambiente, en total oscuridad, durante 48 horas. Los extractos fueron filtrados con filtro de papel y posteriormente se los llevó a sequedad en un evaporador rotatorio, a una temperatura de 40 °C. Posteriormente se pesó el residuo. El extracto crudo seco fue disuelto en MeOH a una concentración de 80 mg de materia seca por ml^{-1} . Para su conservación,

1 ml de cada extracto fue diluido con 9 ml de dimetilsulfóxido (DMSO, Biopack) alcanzando una concentración final de 8000 µg de materia seca por ml⁻¹. Esta solución fue esterilizada utilizando filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (Minisart, Sartorius). Todos los extractos fueron mantenidos en crioviales a -35 °C.

Microorganismo

La cepa de *F. verticillioides* M7075, con reconocida capacidad productora de fumonisinas, fue cedida por la Universidad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Esta fue cultivada en tubos de Synthetischer Nährstoffärmer Agar (SNA) a 28 °C por 7 días. Posteriormente se agregó a cada tubo 5 ml de agua peptonada + Tween 80. Mediante el uso de un vortex se agitó suavemente para facilitar el desprendimiento de los conidios. La suspensión de conidios fue filtrada a través de gasa estéril contenida en un frasco de vidrio. Se realizó el conteo de células mediante cámara de Neubauer y posteriormente se ajustó la suspensión a una concentración entre 1-3 x 10⁴ y 1-3 x 10⁵ unidades formadoras de colonias ml⁻¹ (UFC ml⁻¹), dependiendo del ensayo para realizar.

Medios de cultivo y agente antifúngico

Por una parte, se utilizó el medio sintético Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Gibco by Life Technologies) 1x con L-glutamina sin rojo fenol. Además, el medio SNA compuesto por: fosfato monopotásico (KH₂PO₄) 1,0 g, nitrato de potasio (KNO₃) 1,0 g, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄) 7H₂O 0,5 g, cloruro de potasio (KCl) 0,5 g, glucosa 0,2 g, sacarosa 0,2 g, agar 20,0 g, agua destilada 1000 ml. Por otra parte, el medio PDA (Agar papa dextrosa) proveniente de Oxoid. Y, por último, el colorante Resazurina sódica (0,01% solución acuosa; Sigma-Aldrich EUA) esterilizada por filtración a través de filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (Minisart, Sartorius) y conservada en crioviales a -35 °C.

Como agente antifúngico se utilizó el Ketoconazole (Ke) a una concentración de 2 µg ml⁻¹ para el ensayo colorimétrico de susceptibilidad, tinción con azul de Evans y azul de anilina y test de crecimiento radial del micelio; 50 µg ml⁻¹ para bioautografía de contacto. Todas las soluciones fueron esterilizadas utilizando filtros estériles con membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm (Minisart, Sartorius) y conservadas en crioviales a -35 °C.

Especies vegetales	Voucher n.º	Lugar de recolección	Órgano analizado
<i>Senna aphylla</i> (Cav.) H.S.Irwin & Barneby var. <i>pendula</i> Robbiati & Fortunato	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6922	Córdoba: Dpto. Tulumba, RN 60 3 km S de San José de Las Salinas, 30°01'S, 64°35'O.	Hojas
<i>Senna aphylla</i> (Cav.) H.S.Irwin & Barneby var. <i>aphylla</i>	BAB Fortunato <i>et al.</i> 7764	Salta: Dpto. Molinos, 3 km E de Brealito a RN 40, 25°19'S, 66°21'O.	Frutos
<i>Senna birostris</i> (Dombey ex Vogel) H.S. Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 7813	Salta: Dpto. Cachi, Valle Encantado, R. Prov. 33, 13 km E, 25°10'S, 65°49'O	Hojas
<i>Senna burkartiana</i> (Villa) H.S. Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 8216	Salta: Dpto. St. Victoria, camino a St. Victoria, 800 m O de Rodeo Pampa, 22°30'S, 64°20'O	Frutos
<i>Senna chloroclada</i> (Harms) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6922	Salta: Dpto. Gral. Güemes, R. Prov. 52 (Juana Azurduy), 20 km NO de Fuerte Esperanza, 25°04'S, 62 01' O.	Hojas
<i>Senna hirsuta</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6997	Salta: Dpto. Gral. José de San Martín, 5 km E de Campo Durán, enfrente a REFINOL, 22°12'S, 63°40'O	Hojas
<i>Senna morongii</i> (Britton) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6515	Chaco: Dpto. Gral. Güemes, 47 km de Sauzalito a Santa Rita, 24°25'S, 61°44'O	Hojas
<i>Senna obtusifolia</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6570	Chaco: Dpto. Gral. Güemes, Sauzalito de Fn. Belgrano, 24°25'S, 61°41'O	Hojas
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6569	Chaco: Dpto. Gral. Güemes, Sauzalito de Fn. Belgrano, 24°25'S, 61°41'O	Hojas
<i>Senna spectabilis</i> (DC.) H.S.Irwin & Barneby var. <i>spectabilis</i>	BAB Fortunato <i>et al.</i> 6964	Salta: Dpto. Gral. J. de San Martín, R. Prov. 4, 4 km O de Paraje Las Maravillas, 22°11'S, 63°01'O	Frutos y flores
<i>Senna spiniflora</i> (Burbart) H.S. Irwin & Barneby	BAB Fortunato <i>et al.</i> 10155	Santiago del Estero: Dpto. Gral. Taboada: R Prov. 7, 5 km E de Anatuya. 28°26'S, 62°47'O.	Ramas

Tabla 1. Especies de *Senna* recolectadas de las provincias del norte de Argentina.

Ensayo colorimétrico de susceptibilidad: microdilución en placa de 96 wells

El ensayo colorimétrico de susceptibilidad fue realizado de acuerdo a lo informado en el documento M38-A (NCCLS, 2002), con ciertas modificaciones para la actividad antifúngica (Salvat, 2010). Esta técnica se realizó en microplacas estériles de 96 pocillos (Biofil). Se añadieron 200 µl de las soluciones de MeOH: DMSO (1:9) de los extractos de plantas a cada uno de los pocillos de la fila A, los pocillos restantes de las filas B a la H recibieron 100 µl de RPMI 1640. Para la realización de las diluciones, se tomaron 100 µl de los pocillos de la fila A y se depositaron en los pocillos de la fila B y así sucesivamente hasta la fila H (en dirección vertical). El exceso de dilución (100 µl) de la fila H fue descartado. De esta manera, los pocillos de la fila A contenían la concentración más alta del extracto (4000 µg ml⁻¹) y los pocillos de la fila H la más baja (31,2 µg ml⁻¹). Luego se colocaron 100 µl del inóculo que contenía entre 1-3x10⁴ CFU ml⁻¹ en todos los pocillos, exceptuando al control del medio RPMI 1640. Por último, se depositaron 20 µl de Resazurina a todos los pocillos (Espinell-Ingroff *et al.*, 1995). Se utilizaron algunas columnas en cada placa para los respectivos controles de esterilidad del medio de cultivo RPMI 1640 y estabilidad química del colorante Resazurina (sin el inóculo), de viabilidad del inóculo (sin extracto ni solvente añadido), del agente antifúngico (Ke) a la concentración indicada anteriormente y del efecto del solvente MeOH: DMSO (1:9). La concentración de UFC ml⁻¹ se determinó contando las colonias desarrolladas 48 horas después de añadir una alícuota de 100 µl del inóculo utilizado en el ensayo, en placas de Petri que contenían PDA. Las microplacas fueron incubadas a 28 °C en oscuridad y examinadas a las 48 horas. El cambio de color de azul a rosa de la Resazurina indicaba crecimiento fúngico. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue considerada como la mayor concentración (en µg de materia seca por ml de medio) en la cual no se detecta viraje de color del indicador Resazurina. Cada extracto fue considerado activo cuando su CMI < 500 µg ml⁻¹ (Salvat *et al.*, 2001). Este ensayo se realizó por triplicado.

Posteriormente, en los extractos que mostraron actividad inhibitoria, se realizaron las siguientes técnicas:

Bioautografía de contacto

Para la separación de los extractos se llevó a cabo la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC). Como fase estacionaria, se utilizaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (9x5 cm) donde fueron depositados 20 µl en forma de banda para cada extracto (que corresponde a 400 mg ml⁻¹) y 5 µl para el control positivo (Ke) y como fase móvil la mezcla de n-propanol:acetato de etilo:agua:ácido acético (Wagner y Bladt, 1996), con modificaciones (39:41:29:1). El medio PDA (40 ml) fue inoculado con 600 µl de entre 1-3x10⁵ UFC ml⁻¹ de *F. verticillioides* que luego fue vertido en placas de vidrio (150x25 mm). Los cromatogramas fueron colocados sobre el agar e incubados a 28 °C por 24 horas, luego fueron retirados y se continuó la incubación de las placas por 24

horas más a 28 °C. Finalmente, se visualizaron las bandas de inhibición y se calculó el frente de reacción (Rf): Rf = distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por el solvente (Zacchino y Gupta, 2007). Esta técnica se realizó por triplicado.

Tinción con azul de Evans: visualización de alteración de las hifas

Esporas de *F. verticillioides* fueron incubadas en el medio líquido RPMI 1640 a 28 °C por 24 horas para la formación de las hifas. Transcurrido este período, se transfirió 1 ml del medio conteniendo las hifas a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Luego, a cada tubo se le añadió el extracto activo a su respectiva CMI, se incluyeron también, un tubo como control positivo (Ke), y otro como control del inóculo. Posteriormente se incubaron todos a 28 °C durante 24 horas. Luego, se procedió a centrifugar los tubos y a retirar el medio de cultivo para posteriormente colocar 2 gotas de la solución de azul de Evans (0,05%) por 5 minutos. Finalmente, se realizaron varios lavados con agua destilada estéril para remover el exceso de colorante. La diferencia en la tinción se observó bajo microscopio óptico a 400x y para su evaluación se siguió lo descrito por Semighini y Harris (2010); Savi *et al.* (2013).

Microscopía óptica

Esporas de *F. verticillioides* fueron colocadas en medio PDA el cual contenía diferentes concentraciones (CMI y 2xCMI) del extracto activo, también se incluyeron placas con el control positivo (Ke) y del micelio. Posteriormente, pequeños fragmentos del agar conteniendo micelio, se colocaron en un portaobjetos para luego ser teñidos con una solución acuosa al 1% de azul anilina (AOSA, 2008) por 5 minutos. Finalmente, la morfología de las hifas fue observada para su evaluación al microscopio óptico con aumento de 1000x.

Test de crecimiento radial del micelio

A partir de un cultivo en placa de 7 días de *F. verticillioides* en el medio PDA se tomaron discos de 5 mm de diámetro del cultivo y se colocaron en el centro de placas de Petri conteniendo 20 ml de medio de cultivo PDA con dos concentraciones de uno de los extractos activos (MIC y 2xMIC). Asimismo, se realizaron los respectivos controles correspondientes al inóculo sin tratamiento, el inóculo con el antifúngico (Ke), y el control del solvente en el cual está diluido el extracto (DMSO: MeOH – 9:1). Todas las placas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días. Todos los días se midió el diámetro de las colonias (mm) y se evaluó la eficacia de cada tratamiento (Mier *et al.*, 2002; Quiroga *et al.*, 2009). Este ensayo se realizó por triplicado.

Efecto de los extractos activos sobre la producción total de fumonisinas

A fin de medir las diferencias en la producción de fumonisinas, una suspensión de conidios de *F. verticillioides*

(entre $1-3 \times 10^4$ CFU ml⁻¹) se sembró en placas de Petri con 20 ml de PDA conteniendo a los extractos activos, en sus CMI correspondientes. El mismo procedimiento fue realizado para el control con Ke y control de inóculo. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 15 días. Finalmente, el contenido de fumonisinas presente en el agar se determinó mediante el test de ELISA (ELISA kit Ridascreen® Fast Fumonisin R-Biopharm – Alemania). El límite de detección fue de 0,222 mg kg⁻¹.

Análisis estadístico

Los datos sobre el crecimiento radial del micelio se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido por el postest de Bonferroni. Se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015). El análisis se expresó como media \pm desvío estándar y el valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En el estudio de bioactividad, realizado mediante el ensayo colorimétrico de susceptibilidad, fueron considerados activos aquellos extractos con una CMI < 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solo la especie *S. spectabilis* fue activa contra *F. verticillioides*, con una CMI de 99,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en lo que respecta a los frutos, mientras que para las flores la CMI fue de 437,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (tabla 2). Este resultado en parte es coincidente con los hallazgos reportados por Salvat (2010), quien determinó actividad antifúngica en extractos de hojas de esta especie, pero frente a *F. graminearum*, a una CMI de 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Especie vegetal	Órgano analizado	CMI
<i>S. aphylla</i>	Hojas	1000
<i>S. aphylla</i>	Frutos	1000
<i>S. birostris</i>	Hojas	1000
<i>S. burkartiana</i>	Frutos	1000
<i>S. chloroclada</i>	Hojas	1000
<i>S. hirsuta</i>	Hojas	2000
<i>S. morongii</i>	Hojas	1000
<i>S. obtusifolia</i>	Hojas	1000
<i>S. occidentalis</i>	Hojas	1000
<i>S. spectabilis</i>	Frutos	99,9
<i>S. spectabilis</i>	Flores	437,1
<i>S. spiniflora</i>	Ramas	1000
Ke	---	0,25

Tabla 2. Actividad antifúngica (Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g ml}^{-1}$) de *Senna* ssp. y del Ke frente a *F. verticillioides*. Los datos se muestran como valores medios de CMIs obtenidos por triplicado.

Para establecer la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de frutos y flores de *S. spectabilis*, se utilizó la técnica de bioautografía de contacto. Con esta técnica, se pudo observar una banda amarilla cuyo Rf = 1, coincidente con la banda de inhibición en el agar (figura 1).

Por una parte, en relación con la tinción con el colorante azul de Evans (figura 2), las hifas expuestas a los dos extractos activos de *S. spectabilis* se encontraban teñidas de azul, lo cual indicaría que sufrieron algún tipo de daño en sus membranas plasmáticas debido a que no pudieron excluir al colorante. En cambio, las hifas control, cuyas membranas permanecieron intactas mantuvieron su coloración normal. Por otra parte, cuando las hifas del micelio desarrolladas en el medio PDA que contiene al extracto de frutos de *S. spectabilis* fueron teñidas con azul de anilina, se pudo observar una alteración en la integridad celular a nivel de citoplasma, sobre todo por la marcada presencia de vacuolas (figura 3). En el caso del extracto de frutos de *S. spectabilis* en el test de crecimiento radial del micelio, se evidenció la capacidad que tuvo para reducir el crecimiento de *F. verticillioides* cuando fue evaluado por un lapso de 7 días (figura 4).

Respecto a la producción de fumonisinas (tabla 3), cuando *F. verticillioides* fue expuesto a extractos de frutos de *S. spectabilis* se produjo una inhibición del 48,3%, en cambio en los extractos de flores el porcentaje fue mayor (86,3%), mientras que con el antifúngico (que en este caso corresponde a Ke) esta inhibición solo fue de un 19%, respecto al control.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo es continuidad de estudios de bioprospección que se están realizando desde el año 2001. Sobre esta base, especies nativas del norte de Argentina fueron evaluados a fin de conocer su bioactividad ante *F. verticillioides* conocido por sus implicancias en la actividad productiva. Según los resultados de este trabajo, la actividad antifúngica frente a un mismo microorganismo no resultó ser igual en todas las especies estudiadas y además varió según el órgano del cual se obtuvo el extracto. Antecedentes de similar respuesta se han registrado en otros géneros, como *Polygonum* (Derita *et al.*, 2009).

En cuanto al ensayo colorimétrico de susceptibilidad que nos permitió determinar la CMI de los extractos evaluados, consideramos que si bien el DMSO:MeOH que se utilizó para diluir los extractos posee una cierta inhibición por sí mismo, esta se encuentra contemplada dentro de los primeros cuatro pocillos, por lo que las siguientes diluciones solo corresponderían a la actividad inhibitoria del extracto vegetal, que en este caso solo correspondió a los frutos y las flores de *S. spectabilis*. Sobre esta base, si tenemos en cuenta que los compuestos o principios activos responsables de la actividad contenida en las plantas generalmente se encuentran en menor proporción, estos dos extractos muestran una fuerte acción aun estando a una baja dilu-

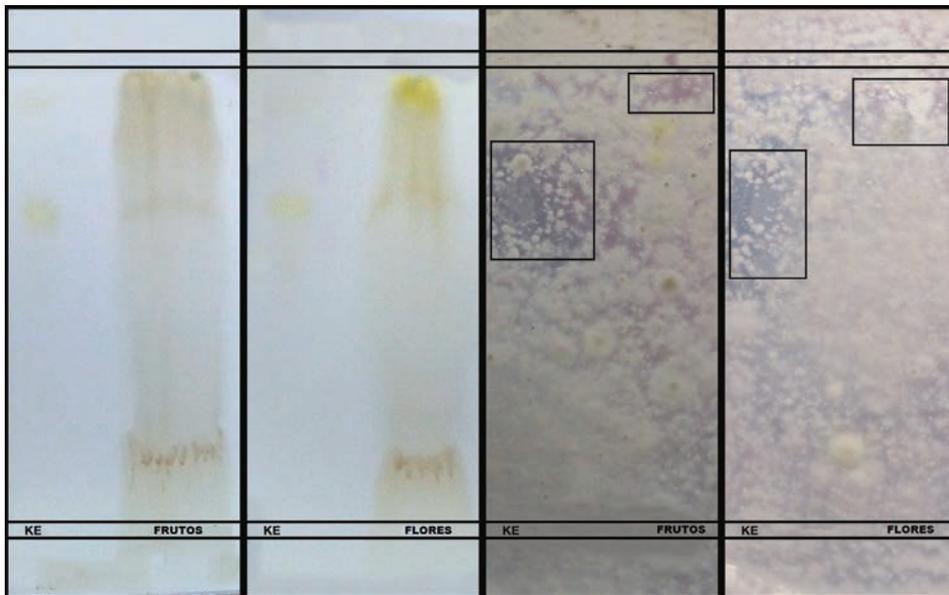


Figura 1. Bioautografía de contacto: (A) TLC del extracto de frutos de *S. spectabilis*. (B) TLC del extracto de flores de *S. spectabilis*. (C) Bioautografía de contacto del extracto de frutos de *S. spectabilis*. (D) Bioautografía de contacto del extracto de flores de *S. spectabilis*.

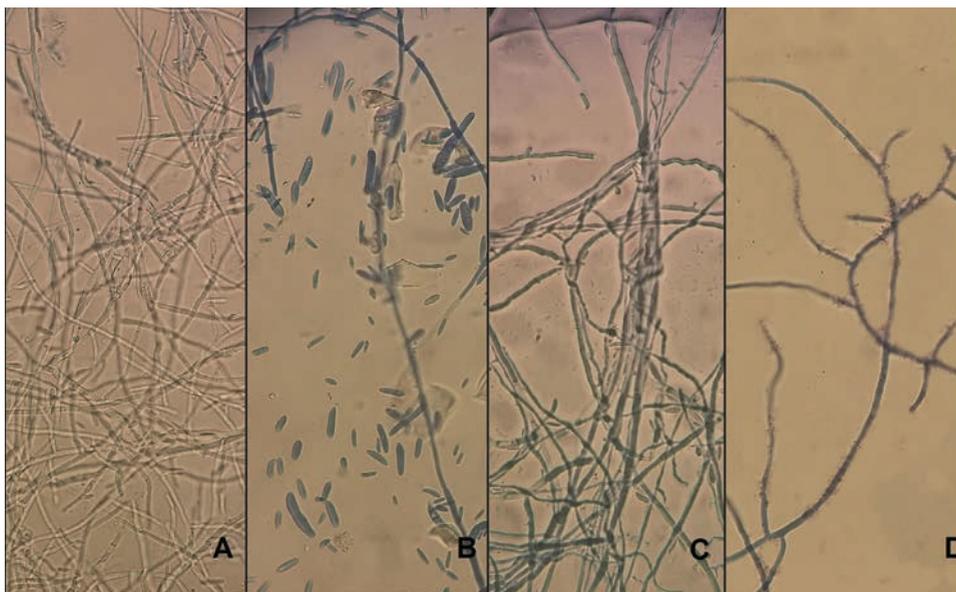


Figura 2. Coloración con azul de Evans: visualización de la alteración de las hifas: (A) Control (hifas vivas). (B) Ke. (C) Extracto de frutos de *S. spectabilis*. (D) Extracto de flores de *S. spectabilis*.

ción. Ante la susceptibilidad observada de este hongo frente a *S. spectabilis*, podría estar incluida dentro de la lista de otras especies evaluadas, que para este tipo de actividad mundialmente solo se encuentra en un pequeño porcentaje (Mccarthy *et al.*, 2000; Newman y Cragg, 2007).

Además, con el fin de iniciar una aproximación para la identificación de los posibles compuestos responsables de

la actividad antifúngica, la bioautografía de contacto resultó ser una herramienta de utilidad ya que permitió la separación de los extractos metanólicos activos y la posterior observación de bandas, alguna de las cuales fueron coincidentes con los halos de inhibición del hongo. Esto podría relacionarse con lo establecido por Wagner y Bladt (1996) quienes determinaron en el género *Senna* la presencia del

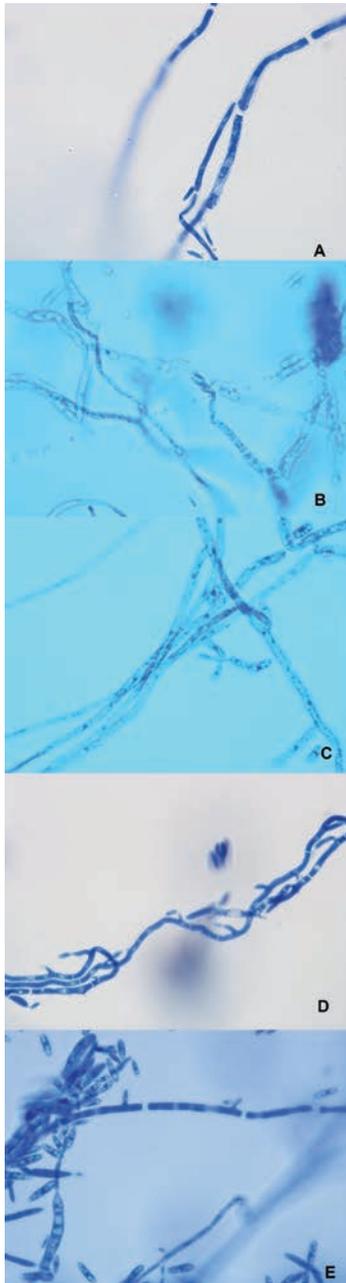


Figura 3. Coloración con azul de anilina: (A) Control (hifas). (B) Extracto de frutos de *S. spectabilis* (99,9 µg ml⁻¹). (C) Extracto de frutos de *S. spectabilis* (198,9 µg ml⁻¹). (D) DMSO:MeOH. (E) Ke (2 µg ml⁻¹).

compuesto antraquinona emodina coincidente con el frente de reacción (Rf) observado en este trabajo. Del mismo modo Guarize *et al.* (2012) y Andrade *et al.* (2015) estudiaron a este compuesto, el cual presentó actividad antibacteriana, efectos antiinflamatorios, laxantes y de motilidad intestinal. Asimismo, existen varios informes de poblaciones de *S. spectabilis* provenientes de Brasil cuyas flores y frutos tienen efectos farmacológicos asociados a la presencia de más de 20 alcaloides de piperidina y piperina con propiedades anal-

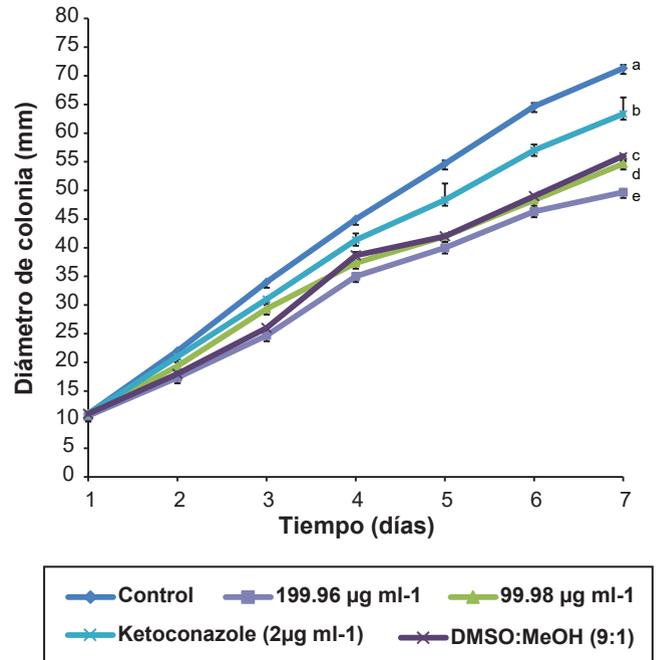


Figura 4. Actividad antifúngica del extracto de frutos de *S. spectabilis* frente a *F. verticillioides* (M7075) en PDA a diferentes concentraciones (los datos se muestran como valores promedio y desviación estándar del diámetro de colonia). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tratamientos.

Muestras	*Fumonisinas totales mg Kg ⁻¹	Efecto inhibitorio en la síntesis de fumonisinas (%)
Control	16,8	0
Ke	13,6	19,1
Frutos de <i>S. spectabilis</i>	8,7	48,3
Flores de <i>S. spectabilis</i>	2,3	86,3

* Test ELISA

Tabla 3. Actividad antifumonisina de los frutos y flores de *S. spectabilis* frente a *F. verticillioides*.

gésicas y antiinflamatorias, entre otros (Viegas Júnior *et al.*, 2006). Estos datos y los observados en este trabajo son un punto de partida importante para futuras investigaciones, a fin de permitir caracterizar fitoquímicamente el o los compuestos activos, responsables de la actividad antifúngica.

Otra evidencia de este tipo de actividad, por parte de los extractos de *S. spectabilis*, fue manifiesta al observar mediante la tinción con el colorante azul de Evans que la per-

meabilidad celular estaba afectada, mientras que la tinción con azul de anilina permitió observar además daños a nivel citoplasmático. Sobre estos resultados sería deseable profundizar en la observación de los daños que se producen en las hifas por la acción de estos extractos, mediante la incorporación de otras técnicas de microscopía que ofrezcan mayor definición y exactitud.

A la hora de evaluar el efecto inhibitorio de la CMI y 2xCMI (99,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 199,96 $\mu\text{g ml}^{-1}$) de frutos de *S. spectabilis*, mediante el test de crecimiento radial del micelio, se pudo observar que a partir del segundo día de incubación se produjo una demora en el desarrollo del micelio en todos los tratamientos. En cambio, a partir del sexto día, las dos concentraciones del extracto provocaron un notorio retraso respecto al solvente (figura 4). Si bien este test no es concluyente para definir su comportamiento como fungicida o fungistático, se pudo observar que el extracto de frutos a estas concentraciones detuvo el desarrollo del micelio, indicando que su modo de acción es del tipo fungistático. Para complementar esta observación sería deseable realizar la técnica "time kill" (Palavecino Ruiz *et al.*, 2016).

Asimismo, resultó interesante la inhibición en la producción de fumonisinas cuando se hizo crecer a *F. verticilloides* en medio conteniendo los extractos de frutos y flores de *S. spectabilis* y en el medio conteniendo Ke. La inhibición en la producción de la toxina por los extractos fue mayor a la producida por el fungicida. Como es sabido, la capacidad de *Fusarium* para producir fumonisinas no solo depende de la cepa, sino también de los genes presentes en el hongo, del medio de cultivo o sustrato (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014) o de factores ambientales entre otros (Martínez *et al.*, 2010). En otros casos de especies nativas del norte argentino, se pudieron identificar algunos compuestos con una marcada actividad antifumonisina (Aristimuño Ficoseco *et al.*, 2014). Sin embargo en nuestro caso aún no se pudo determinar el compuesto responsable de dicha actividad. Sobre esta base se señala que estos sucesos refuerzan el concepto que las plantas tienen un enorme valor y son fuente de nuevas moléculas que aún faltan descubrir.

Para países productores de granos como Argentina, que en el año 2016 produjo más de 110 millones de toneladas entre cereales y oleaginosas (USDA, 2016), la presencia de especies como *Fusarium* en los cultivos y granos almacenados, representan una amenaza en varios sentidos. Contar con estudios que involucran a plantas nativas como alternativa de control de enfermedades fitopatogénicas podrían derivar en el futuro en opciones conducentes a aplicaciones de utilidad, contribuyendo de este modo con información sobre nuestra biodiversidad.

Finalmente, los resultados presentados en este estudio podrían ser tenidos en cuenta para futuras investigaciones que nos permitan la identificación de los compuestos activos de los frutos de *S. spectabilis* responsables de la actividad antifúngica frente a *F. verticilloides*, teniendo en cuenta que podría ser el resultado de la combinación de

varios compuestos. Consideramos que serían necesarios estudios adicionales para poder caracterizar y purificar los extractos activos de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos, a la Dra. María Laura Ramírez. Laboratorio de Micología, Dpto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina) por haber cedido la cepa *F. verticilloides* (M7075). Al Sr. Nicolás Di Ciaccio de la Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina, por los aportes en la configuración de imágenes. Asimismo el agradecimiento es extensivo a la Dra. Flavia Hasenauer y la Téc. Rosa Amalia Salvatierra (Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA) por el aporte en las técnicas desarrolladas. Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de los Proyectos: INTA-Argentina/Universidad de Arizona-EUA, (1998 - 2003), y PIP 4197/98 CONICET (1998-2001).

BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, V.; BAJPAI, M. 2010. Pharmacognostical and biological studies on Senna & its products: an overview. *Int J Pharma BioSci* 1 (2).
- ANDRADE, F.I.; PURGATO, G.A.; MAIA, T.; SIQUEIRA, R.P.; LIMA, S.; DIAZ, G.; NOGUEIRA DIAZ, M.A. 2015. Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. *J Evid-Based Complementary Altern Med*. Volumen 2015, Artículo ID 217598.
- ANTHONEY, T.S.; NGULE, M.C.; OBEY, J.K. 2014. Evaluation of in vitro antibacterial activity in Senna didymobotrya roots methanolic-aqua extract and the selected fractions against selected pathogenic microorganisms. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3 (5): 362–376.
- AOSA. 2008. Rules for testing seeds fungal endophyte testing. Section 10.
- ARISTIMUÑO FICOSECO, M.E.; VATTUONE, M.A.; AUDE-NAERT, K.; CATALÁN, C. A.N.; SAMPIETRO, D.A. 2014. Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in Anacardiaceae species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *Fusarium* species. *J. Appl. Microbiol.*, 116(5), 1262–1273.
- BARQUERO, A. 2007. Plantas sanadoras. Pasado, presente y futuro. *Rev. Quím. Viva* 2(6): 19–35.
- CABRERA, A.L. 1994. Regiones fitogeográficas argentinas. En: KUGLER, W.F. (Ed.). *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*. Tomo 2. 2.ª edición. 1.ª reimpresión. Acme. Buenos Aires. Argentina. Fascículo 1. 1–85 pp.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. 2008. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hypoxis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev Bras Farmacogn* (18) (Supl.): 670–675.
- COWAN, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* (12): 564–582.
- DE ALBUQUERQUE MELO, G.M.; RODRIGUES SILVA, M.C.; PEREIRA GUIMARÃES, T.; PINHEIRO, K.M.; BRITO DA MATTA, C.B.; DE QUEIROZ, A.C.; PIVATTO, M.; DA SILVA BOL-

- ZANI, V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; VIEGAS JÚNIOR, C. 2014. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. *Phytomedicine* 21 (3): 277–281.
- DE LA TORRE-HERNÁNDEZ, M.E.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; GALEANA-SÁNCHEZ, E.; PLASENCIA-DE LA PARRA, J. 2014. Fumonisin–Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP*, 17(1): 77–91.
- DEFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. 2004. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). Washington, DC: Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. 72–73 pp.
- DERITA, M.G.; LEIVA, M.L.; ZACCHINO, S.A. 2009. Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties of *Polygonum acuminatum* Kunth. *J Ethnopharmacol.* 124(3):377–83.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar>) verificado: 01 de febrero de 2017).
- ESPINEL-INGROFF, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V. 1995. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole resistant and susceptible isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* (33): 3154–3158.
- GARRIDO, C.E.; HERNÁNDEZ PEZZANI, C.; PACIN, A. 2012. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control* (25): 660–665.
- GUARIZE, L.; DA COSTA, J.C.; DUTRA, L.B.; MENDES, R.F.; LIMA, I.V.A.; SCIO, E. 2012. Anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of *Senna macranthera* leaves. *Nat. Prod. Res.: Formerly Nat. Prod. Lett.* 26 (4): 331–343. DOI: 10.1080/14786411003754264.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. 1982. The American Cassiinae. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 35 (1–2): 918 p.
- JOTHY, S.L.; TOREY, A.; DARAH, I.; CHOONG, Y.S.; SARAVANAN, D.; CHEN, Y.; LATHA, L.Y.; DEIVANAI, S.; SASIDHARAN, S. 2012. *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: A promising traditional herb in health improvement. *Molecules* (17), 10292–10305.
- LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KANEKO, T.M. 2009. Ethnic, biological and chemical aspects of *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Rev. ciênc. farm. básica apl.* 30 (1): 9–17.
- LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KATO, E.T.M.; MATHOR, M.B.; DE JESUS ANDREOLI PINTO, T.; KANEKO, T.M. 2015. Evaluation of in vitro biological properties of *Senna occidentalis* (L.) Link. *Acta Sci Biol Sci* 37 (1): 9–13.
- MARASAS, W. 2001. Discovery and Occurrence of the Fumonins: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 109, Supplement 2. 239 p.
- MARTÍNEZ, M.; MOSCHINI, R.; BARRETO, D.; BODEGA, J.; COMERIO, R.; FORJAN, H.; PIATTI, F.; PRESELLO, D.; VALENTINUZ, O. 2010. Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisin en granos de maíz. *Trop Plant Pathol* 35 (5): 277–284.
- MCCARTHY, P.; CHEN, Y.; WRIGHT, A.; CHILSON, K.; SCHIMOLER, R.; SELITRENNIKOFF, C. 2000. New antifungal natural products from marine invertebrates. *Abstr. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sep 17-20; 40: 202.
- MIER, T.; TORIELLO, C.; ULLOA, M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos. UNAM. 34 p.
- MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; ÁLVARES PEREIRA, N.; DEFILIPPS, A. 2000. Medicinal plants of Brazil. Reference Public., Nueva York. 501 p.
- NEWMAN, D.; CRAGG, G. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461–477.
- NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard.
- PALAVECINO RUIZ, M.D.; ORDÓÑEZ, R.M.; ISLA, M.I.; SAYAGO, J.E. 2016. Activity and mode of action of *Parastrephia lepidophylla* ethanolic extracts on phytopathogenic fungus strains of lemon fruit from Argentine Northwest. *Postharvest Biol. Technol.* (114), 62–68.
- PRESELLO, D.A.; BOTTA, G.; IGLESIAS, J.; EYHERABIDE, G.H. 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *J Crop Prot.* (27): 572–576.
- QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, D.A.; SGARIGLIA, M.A.; SOBERÓN, J.R.; VATTUONE, M.A. 2009. Antimycotic activity of 5'-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species. *International journal of food microbiology*, 132(1), 42–46.
- RAMOS, G.; MANTECÓN, A.R.; DE FRUTOS FERNÁNDEZ, P.; GIRÁLDEZ GARCÍA, F.1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivos Zootecnia* 47 (180): 597–620.
- RANDELL, B.R.; BARLOW, B.A. 1998. *Senna circinnata* Flora of Australia (12): 89–138. CSIRO: Melbourne.
- SALVAT, A.E.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. 2001. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* (32): 293–297.
- SALVAT, A.E.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine* (11): 230–234.
- SALVAT, A.E. 2010. Actividad antifúngica de extractos de plantas autóctonas sobre *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium graminearum*. Tesis de maestría, Universidad de San Martín.
- SAVI, G.D.; VITORINO, V.; BORTOLUZZI, A.J.; SCUSSEL, V.M. 2013. Effect of zinc compounds on *Fusarium verticillioides* growth, hyphae alterations, conidia, and fumonisin production. *J. Sci. Food Agric.* 93 (13): 3395–3402.
- SEMIGHINI, C.P.; HARRIS, S.D. 2010. Methods to detect apoptotic-like cell death in filamentous fungi, *Methods Mol. Biol.* (638): 269–279.
- SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A.B.; MONACHE, F.D.; GETTE, M.A.; ZACCHINO, S.; CECHINEL-FILHO, V. 2007. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). *Rev Bras Farmacogn.* (17): 578–582.
- SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn.* (17): 572–577.
- SILVA JUNIOR, I.F.; RAIMONDI, M.; ZACCHINO, S.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; RAO, V.S.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. 2010. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark

extracts, fractions and ellagic acid. *Rev Bras Farmacogn.* 20 (3): 422–428.

USDA. 2006. Grain Fungal Diseases and Mycotoxin Reference. EUA.

USDA. 2016. World Agricultural Production. EUA. Circular Series, WAP 12–16.

VIEGAS JÚNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V.S. 2006. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Quim Nova* 29 (6): 1279–1286.

VOSS, K.A.; SMITHB, G.W.; HASCHEKC, W.M. 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim. Feed Sci. Technol.* (137): 299–325.

WAGNER, H.; BLADT, S. 1996. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas, second ed. Munich, Alemania. 68–70 pp.

ZACCHINO, S.A.; GUPTA, M.P. 2007. Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. Corpus Editorial y Distribuidora: Rosario. 57–73 pp.

Uso de subproductos de planta de algodón como fuente de fibra en dietas de engorde a corral

Arroquy, J.I.; Lopez-Fernandez, C.J.; Lopez, A.

Estimación de biomasa aérea de *Grevillea robusta* A. implantada en la provincia de Misiones, Argentina

Barth, S.R.; Boca, T.; Giménez, A.M.; Joseau, M.J.; Gauchat, M.E.; Fassola, H. E.

Interacción entre festuca alta infectada con endófito y *Lotus tenuis* bajo dos frecuencias de defoliación

Petigrosso, L.R.; Assuero, S.G.; Vignolio, O.R.; Romano, Y.; Colabelli, M.N.; Salvat, A.; Cristos, D.

Caracterización de genotipos de *Gossypium hirsutum* L. sobre su tolerancia a estrés hídrico

Spoljaric, M.V.; Tcach, M.A.; Rojas, J.M.; Tarrago, J.R.; Cointry, E.L.

Drenes subsuperficiales: control de la salinización edáfica en producciones intensivas bajo cubierta

Cuellas, M.; Alconada Magliano, A.

Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis bovina en bovinos reactivos positivos a la prueba tuberculínica

Garbaccio, S.G.; Delgado, F.O.; Zumárraga, M.J.; Rodríguez, L.R.; Huertas, P.S.; Garro, C.J.; Montiel, M.G.; Perelman, S.; De La Vega, A.J.

Essential oils from Argentinean native species reduce *in vitro* methane production

García, F.; Brunetti, M.A.; Lucini, E.I.; Scorcione Turcato, M.C.; Moreno, M.V.; Frossasco, G.P.; Colombatto, D.; Martínez, M.J.; Martínez Ferrer, J.

Pureza física y germinación de cariopses de *Chloris gayana* Kunth y *Panicum coloratum* L. cosechados de plantas cultivadas en un suelo alcalino-sódico

García, M.D.; Pesqueira, J.; Otondo, J.

Pérdida de forraje ocasionada por diferentes densidades de *Dichroplus maculipennis* (Acrididae: Melanoplinae) en una pastura de *Festuca arundinacea* Schreb

Mariottini, Y.; De Wysiecki, M.L.; Lange, C.E.

Tolerancia a las heladas por superenfriamiento en cultivares de nogal (*Juglans regia*) y almendro (*Prunus amygdalus*)

Rodríguez, A.; Benítez Piccini, E.; Muñoz, A.

Actividad antifúngica de especies del género *Senna* (Caesalpinoideae, Leguminosae) del norte de Argentina frente a *Fusarium verticillioides*

Di Ciaccio, L.S.; Fortunato, R.H.; Salvat, A.E.

