

Gramíneas y Leguminosas Tropicales... Proyecto IP-5

COLECCION HISTORICA

Número 2, Agosto de 1997

Avances en la investigación de factores antinutricionales en leguminosas forrajeras tropicales*

Un alto número de leguminosas tropicales herbáceas y leñosas contiene niveles altos de taninos condensados (TC), los cuales tienen efectos negativos sobre el consumo, la digestibilidad y la utilización de nitrógeno por los rumiantes. Para desarrollar metodologías de selección de leguminosas tropicales y para definir las estrategias para su utilización en sistemas de alimentación, es necesario entender cómo los TC y otros factores antinutricionales afectan la nutrición de los rumiantes. En forma adicional, para definir nichos para diferentes especies de leguminosas tropicales es importante conocer cómo la concentración de TC cambia con las condiciones ambientales.

Antecedentes

En investigaciones recientes en el CIAT se ha demostrado que altos niveles de TC tienen un efecto negativo en el consumo, la digestibilidad y la utilización de nitrógeno por ovinos alimentados con *Desmodium ovalifolium* y *Flemingia macropylla*. Por otra parte, en los trabajos del Proyecto Gramíneas y Leguminosas Tropicales del CIAT, se ha encontrado que existen diferencias entre especies de leguminosas:

- En el tipo de tanino presente en el forraje (p. ej., hidrolizable y condensado).
- En la distribución de los TC en las hojas (p. ej., soluble y ligado).
- En la actividad biológica de los TC solubles (p. ej., afinidad con proteína).

Con base en estos resultados, el Proyecto ha orientado la investigación en TC hacia:

- La calibración de métodos de laboratorio para la determinación de estos compuestos.
- Una mejor definición del papel de los taninos en leguminosas en relación con digestión y productos finales de la fermentación por microorganismos del rumen.
- La definición y cuantificación de los diferentes tipos de taninos (p. ej., monómeros y dímeros) utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC, sus iniciales en inglés).
- El desarrollo de curvas de calibración para medir TC y otros atributos de calidad de gramíneas y leguminosas tropicales, utilizando espectrometría infrarroja (NIRS, sus iniciales en inglés).

* Contribución de R. Barahona, M. Theodoru, P. Morris, E. Owen, N. Narváez y C. Lascano.



Circular...**Gramíneas y Leguminosas Forrajeras**

Gramíneas y Leguminosas Forrajeras Tropicales... Proyecto IP-5 es un medio de información del Proyecto Gramíneas y Leguminosas Tropicales: Optimización de la diversidad genética para usos múltiples (Proyecto IP-5 del CIAT). Se publica tres veces al año en abril, agosto y diciembre y su objetivo es mantener la comunicación con las personas e instituciones colaboradoras en la identificación y desarrollo de germoplasma de gramíneas y leguminosas con potencial en sistemas de producción en regiones húmedas y subhúmedas del trópico de América Latina.

Director: Carlos E. Lascano,
 Coordinador del Proyecto IP-5.
 Tel. (57-2)445000 Ext. 3636
 Fax: (57-2)4450073
 E-mail: c.lascano @ CGNET.com

Edición: Alberto Ramírez P.

CIAT
 Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia.

Para lograr estos objetivos, el Proyecto Gramíneas y Leguminosas del CIAT está colaborando estrechamente con el Institute of Grassland and Environmental Research (IGER) de la Gran Bretaña mediante estudios dirigidos a desarrollar metodologías y entender mejor el efecto de los taninos en la nutrición de rumiantes. Algunos de los avances más significativos en cada uno de los temas anteriores aparecen a continuación.

Extracción de taninos utilizando diferentes solventes

En el Laboratorio de Calidad de CIAT se compraron diferentes procedimientos para la

extracción de taninos: (1) acetona acuosa al 70%; (2) metanol acuoso al 70%; (3) acetona acuosa al 70%, seguido de evaporación y extracción con éter dietil y dilución con metanol; y (4) acetona acuosa al 70%, seguido de evaporación de la acetona y dilución con metanol. Los resultados del Cuadro 1 indican que, para determinar TC de un rango de leguminosas no existen diferencias entre el uso de metanol o acetona seguido de evaporación. No obstante, cuando la acetona no se evaporó el nivel de TC fue dos o tres veces más alto que con otros métodos de extracción.

En general, los resultados muestran que para la determinación de TC en leguminosas tropicales con altos niveles de taninos condensados se puede utilizar metanol en lugar de acetona, la cual es más costosa y difícil de conseguir en el mercado.

Distribución de taninos en el tejido de la hoja

Los resultados de estudios previos, en colaboración con la Universidad de Massey (Nueva Zelanda), mostraron que existen diferencias entre leguminosas tropicales en la proporción TC solubles y ligados; así, mientras en *Senna velutinum* y *Acacia boliviana* todos los TC fueron solubles, en *Gliricidia sepium* todos fueron ligados. En trabajos subsiguientes, se analizaron los TC solubles y ligados en hojas jóvenes y maduras de un rango de leguminosas. Los resultados (Cuadro 2) mostraron que, en todas ellas entre 65% y 90% de los taninos presentes eran solubles y que solamente entre 10% y 35% estaban, posiblemente, ligados a la pared celular.

Cuadro 1. Efecto del método de extracción en la determinación de taninos solubles condensados (% de MS) en varias leguminosas tropicales.

Leguminosa	Métodos de extracción			
	Acetona ^a	Metanol ^b	Acetona ^c + Éter	Acetona ^d + Evaporación
<i>L. leucocephala</i>	18.3	8.6	8.3	8.6
<i>D. ovalifolium</i>	24.2	8.9	9.4	9.3
<i>F. macrophylla</i>	18.9	9.7	9.5	9.6

a. Acetona acuosa (70%). b. Metanol acuoso (70%). c. Acetona acuosa (70%), seguido de evaporación y extracción con dietil-éter (dilución con metanol). d. Acetona acuosa (70%), seguido de evaporación (dilución con metanol).

Sin embargo, fue interesante observar en algunas leguminosas, como *Calliandra calothyrsus* y *Leucaena leucocephala*, diferencias en la relación taninos solubles:taninos ligados debidas al estado de madurez, lo que no ocurrió en las demás leguminosas evaluadas.

Efecto de los taninos en la digestión y producción de ácidos grasos volátiles

Un objetivo principal en el Proyecto IGER-CIAT es identificar el efecto de los TC en la digestión de la pared celular de las leguminosas tropicales. Utilizando la técnica de producción in

vitro de gas, desarrollada por IGER y empleada por el Laboratorio de Calidad de Forrajes en el CIAT, es posible medir la degradación de los productos finales de la digestión de varias especies de leguminosas por los microorganismos del rumen. Los resultados hasta la fecha, han mostrado grandes diferencias en los parámetros de fermentación de siete leguminosas tropicales (Cuadro 3). Por ej., la degradación de la MS de *Flemingia macrophylla* fue extremadamente baja (22%) en comparación con las demás leguminosas que presentaron un rango entre 41% y 62%. Por otra parte, la degradación de *Leucaena macrophylla* (48%) —que no tiene TC medibles— fue menor que la de *L. leucocephala* (62%), pero similar a la de *L. pallida* (46%) que sí

Cuadro 2. Proporción de taninos solubles y condensados en hojas inmaduras y maduras de diferentes leguminosas tropicales. (Barahona et al., datos no publicados).

Leguminosa	Estado	Proporción de taninos condensados (%)	
		Solubles	Ligados
<i>C. calothyrsus</i>	Inmaduro	90.3	9.7
	Maduro	66.3	33.7
<i>C. fairchildiana</i>	Inmaduro	77.4	22.6
	Maduro	74.6	25.4
<i>D. ovalifolium</i>	Inmaduro	85.8	14.2
	Maduro	85.4	14.6
<i>L. leucocephala</i>	Inmaduro	79.9	21.1
	Maduro	71.5	28.5
<i>L. pallida</i>	Inmaduro	65.0	35.0
	Maduro	64.9	35.1

Cuadro 3. Total de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 144 horas de incubación de diferentes especies de leguminosas con microorganismos del rumen. (Barahona et al., datos no publicados)

Leguminosa	Total	Ácidos grasos volátiles (AGV) (moles/lt)					
		Cadenas simples				Cadenas ramificadas	
		Acético	Propiónico	Butírico	Valérico	Isobutírico	Isovalérico
<i>F. macrophylla</i>	19.5	13.8	4.9	0.9	0.1	0.01	-0.17
<i>D. ovalifolium</i>	20.5	15.3	4.4	1.0	0.2	-0.10	-0.26
<i>C. calothyrsus</i>	23.7	19.1	3.8	0.6	0.5	-0.07	-0.20
<i>L. pallida</i>	28.3	20.1	6.7	1.2	0.3	0.05	-0.06
<i>L. macrophylla</i> ^a	31.9	20.4	7.5	1.8	0.8	0.46	0.94
<i>C. fairchildiana</i>	31.9	22.1	7.6	1.7	0.1	0.28	0.13
<i>L. leucocephala</i>	42.6	29.2	8.7	2.5	1.1	0.36	0.76

a. No se midieron taninos.

tiene TC. Lo anterior sugiere que, las diferencias en digestibilidad dentro de leguminosas forrajeras tropicales es afectada, no solamente por el nivel y distribución de los TC, sino también por la composición de la pared celular.

Los experimentos sobre producción in vitro de gas, que incluyen la fermentación de leguminosas con soluciones buffer, un agente reductor y líquido ruminal han resultado útiles para determinar los productos finales de la fermentación de las leguminosas por los microorganismos del rumen. Los resultados en el Cuadro 3 muestran las diferencias entre leguminosas en el nivel de ácidos grasos volátiles total (AGV) después de 144 horas de fermentación con bacterias del rumen. Como se esperaba, los AGV totales se correlacionaron ($r = 0.77$) con la degradabilidad de la MS, siendo menor en el caso de *F. macrophylla* y mayor en *L. leucocephala*. Por otra parte, la concentración de AGV de cadenas ramificadas, principalmente aquellas formadas a partir de la degradación de proteína, varió entre especies de leguminosas. Los mayores niveles de AGV ramificados se encontraron en las especies sin taninos (*L. macrophylla*) o en las que, aparentemente, tienen menos taninos reactivos como *L. leucocephala*. Esto sugiere que, cuando hay presencia de taninos, ocurre un incremento en la utilización de AGV ramificados por parte de los microorganismos del rumen para síntesis de proteína bacteriana.

Tipos de taninos en leguminosas tropicales

Resultados previos, obtenidos después de ligar los TC solubles con polietilen-glicol (PEG) y de medir el nivel de TC extractables y la astringencia de taninos —habilidad para ligar proteína— sugirieron que, en las leguminosas tropicales existen, por lo menos, tres tipos de taninos: (1) no reactivos con proteína; (2) de baja afinidad con proteína; y (3) de alta afinidad con proteína. Con el objeto de verificar estos hallazgos, se analizaron taninos purificados aislados de seis leguminosas tropicales. Los análisis se hicieron en el IGER utilizando HPLC, y los resultados (Cuadro 4) mostraron diferencias en los tipos de taninos presentes en las leguminosas. Por ej., en *D. ovalifolium* una alta proporciones de TC se encuentra en forma de cianidin, además, esta leguminosa contiene fisetinidin, el cual no se encontró en las otras leguminosas estudiadas. En contraste, la mayoría de los taninos en *F. macrophylla* se encuentran en forma de delfinidin. Estas diferencias pueden explicar la alta afinidad que los taninos de *D. ovalifolium* tienen con proteína si se comparan con los de *F. macrophylla*.

En el caso de *Leucaena*, se encontraron diferencias en tipos de taninos presentes entre especies. Por ejemplo, pelarganidin se encontró en *L. leucocephala*, pero no se encontró en *L. palliada*. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la actividad biológica de los taninos, la digestibilidad y con el valor alimenticio de especies de *Leucaena*.

Cuadro 4. Proporción de constituyentes de proantocianidinas en taninos purificados de especies de leguminosas tropicales, en estado inmaduro. (Barahona et al., datos no publicados).

Leguminosa	Proporción de constituyentes proantocianidinas ^a (%)				
	Cianidin	Delfinidin	Pelarganidin	Fisetinidin	No identificados
<i>C. callothyrsus</i>	82.0	9.1	2.6	—	6.3
<i>C. fairchildiana</i>	39.0	24.1	27.5	—	9.4
<i>D. ovalifolium</i>	85.2	—	1.5	2.6	10.7
<i>F. macrophylla</i>	10.4	83.4	—	—	6.4
<i>L. leucocephala</i>	28.2	59.2	5.5	—	6.7
<i>L. pallida</i>	14.3	71.3	—	—	14.4

a. HPLC.

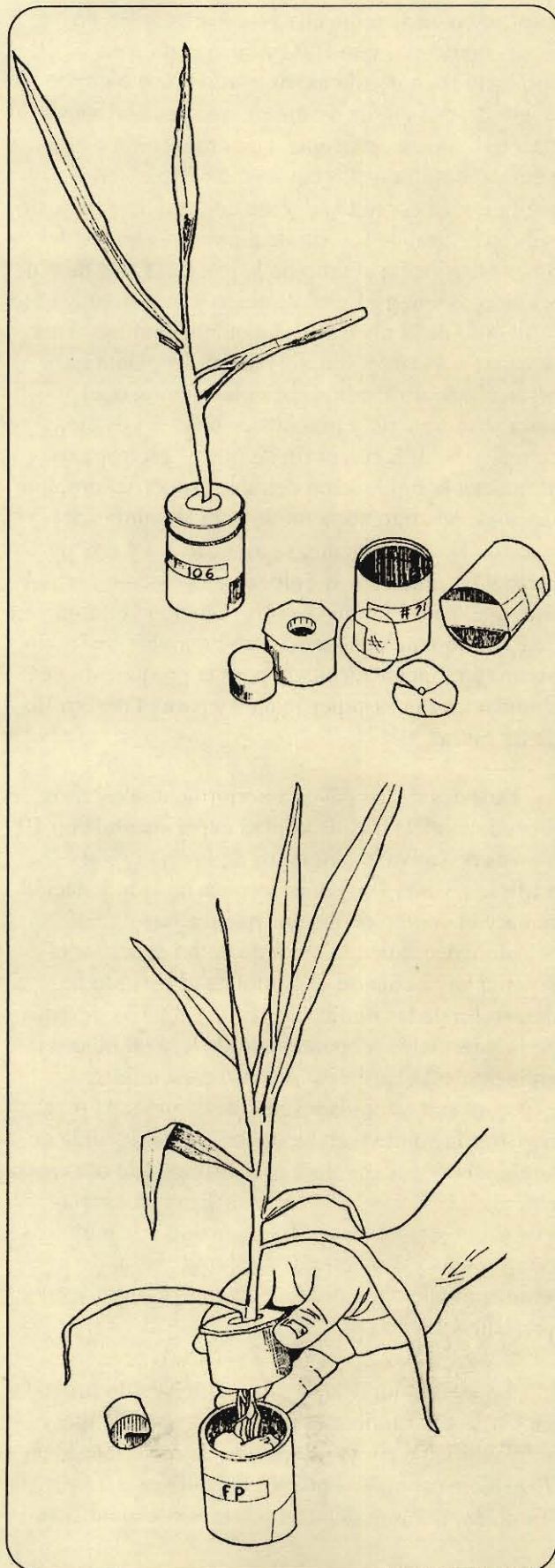
Nueva metodología para evaluar genotipos de *Brachiaria* spp. por resistencia a salivazo**

Como se sabe, el mejoramiento de *Brachiaria* es una de las actividades más importantes del Proyecto Forrajes Tropicales del CIAT. Habiendo superado los problemas de manipulación de la apomixis en poblaciones segregantes de *Brachiaria*, se ha establecido un exitoso programa de mejoramiento cuyos principales objetivos son la obtención de materiales con resistencia a salivazo, adaptación a suelos ácidos e infértiles, alta calidad forrajera y buen potencial de producción de biomasa.

Las prioridades de mejoramiento están claramente definidas y se han desarrollado metodologías de evaluación para diferentes caracteres. Sin embargo, la evaluación por resistencia a salivazo se convirtió en un verdadero cuello de botella para responder a las necesidades de un programa de mejoramiento masivo. La metodología que se venía usando es confiable en términos de identificación de resistencia por antibiosis, pero se caracteriza por su alto costo; demanda de tiempo, espacio y mano de obra; y por las dificultades en la interpretación del daño causado por las ninfas del insecto. En el mejor de los casos, en 1 año permite evaluar entre 250 y 300 genotipos de la gramínea, lo que, obviamente, no es suficiente para un programa de mejoramiento que debe producir miles de nuevos híbridos cada año.

Con el fin de acelerar el proceso de mejoramiento y facilitar la definición de los diferentes mecanismos de resistencia al insecto, en 1996 se iniciaron trabajos tendientes a desarrollar una metodología fácil, rápida y confiable que permitiera evaluar miles de genotipos con una mínima inversión de recursos.

* En la nueva metodología para evaluación de resistencia a salivazo la unidad experimental consiste en un sistema en el cual se acoplan dos



consiste en un sistema en el cual se acoplan dos piezas fabricadas con PVC de uso común en instalaciones hidráulicas: una unión de 6.5 cm de longitud y 5.3 cm de diámetro, que hace las veces de macetero, la que se acopla a una reducción o buje de 3 cm de longitud y 4.8 cm de diámetro exterior y que funciona como tapa. Esta unión o buje tiene un orificio central de 2.2 cm de diámetro a través del cual se desarrolla el tallo de la planta. En la base de la unión se agrega 1 cm³ de suelo y se siembra sobre él un tallo de la planta que se quiere evaluar. Tres semanas más tarde, después de que la planta ha desarrollado un sistema radicular vigoroso, el sistema se invierte y permanece en esta posición entre 7 y 10 días con el fin de que el geotropismo promueva la producción de raíces superficiales, que sirvan de sustrato alimenticio para las ninfas del insecto. Posteriormente, se agregan 3 a 4 cm³ de suelo y las unidades se colocan en posición normal para que ocurra la infestación. Cuando la unión y el buje se acoplan, el sistema crea un ambiente fresco, oscuro y húmedo adecuado para la producción de abundantes raíces superficiales y para el desarrollo de las ninfas.

Después de los pasos anteriormente descritos, se procede a infestar cada unidad experimental con 10 huevos de salivazo obtenidos de la cría masal artificial. Cada 4 a 5 días después de la infestación se hace el conteo de los huevos que han eclosionado, teniendo cuidado de no disturbar el sistema hasta cuando se complete el período de desarrollo de las ninfas (entre 30 y 32 días después de la infestación, dependiendo de las condiciones ambientales). En este momento cada unidad experimental es cuidadosamente examinada para registrar la sobrevivencia de las ninfas (medida de antibiosis) y para evaluar el daño causado por éstas a la planta. Para el efecto, se utiliza una escala visual con valores entre 1 y 5, siendo 1 la ausencia de síntomas y 5 muerte de la planta. Esta evaluación de daño permite detectar materiales que presentan tolerancia al insecto.

La metodología aquí propuesta ha sido probada en varias oportunidades y se ha encontrado que es muy confiable para la selección de materiales de *Brachiaria* con altos niveles de antibiosis a salivazo. También, permite detectar tolerancia e identificar

materiales que combinan los dos mecanismos (tolerancia y antibiosis). Igualmente, se puede utilizar para medir tolerancia al daño causado por adultos del insecto. Otras ventajas son su repetibilidad; fácil manejo; ausencia de interferencias de organismos indeseables como hongos, bacterias o insectos; ocupa 80% menos espacio; requiere 50% menos tiempo de evaluación, y menos suelo y materiales que la metodología tradicional de evaluación de gramíneas por resistencia a salivazo.

Como existe una alta correlación entre daño a la planta y la supervivencia del insecto, es posible limitar los conteos de ninfas a unas pocas plantas de cada material. Los conteos de supervivencia de podrían limitarse a aquellas plantas que muestren poco daño, lo cual indica si el material respectivo es antibiótico, tolerante, o combina ambos mecanismos.

La nueva metodología ha sido ya adoptada para la evaluación rutinaria de materiales en invernadero en el CIAT. Con una adecuada planeación logística de siembras y manejo del insecto, es posible evaluar hasta 2400 materiales por año.

Notas sobre XVIII International Grassland Congress

El Congreso se realizó en Winnipeg y Saskatoon, Canadá, entre el 8 y el 19 de junio y contó con la participación de 1200 investigadores y delegados de 92 países. Al igual que en los anteriores congresos se presentó un alto número de trabajos relacionados con la producción de pastos en zonas templadas. De los trabajos presentados se pueden sacar algunas resultados de importancia, que se resumen a continuación.

Sobre germoplasma

- *Stylosanthes guianensis* (CIAT 184) crece bien en una amplia gama de suelos y clima, particularmente en aquellos ácidos de trópico húmedo. Puede ser utilizado en bancos de

proteína, sistemas de pastoreo, asociado con árboles y para controlar la erosión del suelo.

- *Centrosema pubescens* (CIAT 15610) se adapta bien en suelos fértiles con pH superior a 5.1 en zonas tropicales húmedas.
- *Brachiaria humidicola* (CIAT 6133) crece bien en un amplio rango de fertilidad y pH en el suelo, especialmente en áreas húmedas tropicales. Tiene una excelente persistencia y ayuda en el control de la erosión.
- *Andropogon gayanus* (CIAT 621) ha dado buen resultado en zonas con largos períodos de sequía, en condiciones de suelos de baja fertilidad. Se puede utilizar para pastoreo o como forraje para corte.
- En Campo Grande (Brasil), investigadores de EMBRAPA desarrollaron una población sintética a partir de germoplasma de *S. capitata* y *S. macrocephala* que ha mostrado tolerancia a antracnosis.
- En Brisbane y Los Baños, Filipinas, se ha encontrado una variación considerable en resistencia a psyllid en *Leucaena collinsi*, *L. diversifolia* y *L. pallida*. No obstante, se ha encontrado poca variación en tolerancia al insecto en las subespecies *glabrata* y *leucocephala* (*L. leucocephala*), lo cual refleja la estrecha diversidad genética de esta especies.

Sobre calidad de forrajes

- Algunas leguminosas tropicales tienen factores antinutricionales que presentan sinérgismo, por

ejemplo, *Sesbania sesban* posee taninos y saponinas. Genotipos de esta leguminosa bajos en taninos han mostrado alta toxicidad en raciones para pollos debido a la presencia de saponinas. En contraste, no se han observado síntomas de toxicidad por saponinas con el suministro de genotipos altos en taninos.

- Se encontró una alta correlación entre los métodos *in sacco* e *in vitro* (Telley y Terry) y el método de producción de gas en la degradabilidad de la MS de forrajes y ensilaje.
- Se encontró que, la espectrometría de rayos infrarrojos (NIRS, en inglés) es útil para predecir la degradación de la proteína por enzimas fungosas y microorganismos del rumen en el método *in sacco* ($R^2 = 0.77$).
- En Edimburgo, utilizando la técnica de producción de gas, se encontró que, *Arachis pintoi*, tiene la mejor calidad forrajera en comparación con *C. pubescens*, *S. guianensis* y *Macroptilium atropurpureum*.

Sobre manejo del pastoreo

- En várzeas del Cerrado de Brasil, *A. pintoi* asociado con *Paspalum atratum* produce hasta 700 g/animal por día en la época de lluvias, siendo esta pastura una alternativa para las zonas inundadas con suelos ácidos.
- En Nigeria, se encontró que la mezcla de leguminosas, como *Aeschynomene histrix* con *Centrosema* sp. es una buena alternativa para complementar y compensar las pérdidas de leguminosas a través del tiempo.

Simposio Internacional Sobre Nutrición de Herbívoros

Entre el 11 y el 16 de abril de 1999 se celebrará en San Antonio, Texas, el Quinto Simposio Internacional Sobre Nutrición de Herbívoros. El tema central del Simposio será la integración entre el manejo de los recursos ecológicos y su uso para la nutrición de herbívoros. Se tratarán las relaciones entre el manejo de los ecosistemas naturales y los sistemas de manejo intensivo y extensivo de herbívoros. Como novedades del Simposio, 1 mes antes y 6 mes después, se presentarán en hoja de correo electrónico (<http://cnrit.tamu.edu/conf/isnh/>) los resúmenes de los trabajos que se expondrán en plenaria, y para abril 10, 11 y 17 de 1999 se tienen programadas varias presentaciones vía satélite. Esto facilitará la discusión de los temas por parte de los participantes.

Los temas para las sesiones plenarias son los siguientes:

- (1) Perspectivas ecológicas y evolución en la nutrición de herbívoros;
- (2) Interacciones forrajes-herbívoros;
- (3) Interacciones entre digestión de dietas y ecología microbiana;
- (4) Transformaciones metabólicas de nutrientes;
- (5) Nutrición de rumiantes con alta capacidad de producción y nutrición e interacción con genotipo; y
- (6) Sostenibilidad de sistemas que incluyen herbívoros.



La organización del Simposio está invitando a todos los investigadores en el campo de la nutrición de herbívoros a presentar 'posters' con énfasis en estudios biológicos y modelamiento de sistemas. Los títulos y resúmenes de los trabajos deben someterse antes de setiembre de 1998 y los posters antes de diciembre de ese año.

Para mayor información dirigirse a:

William C. Ellis
Chairman, The Fifth ISNH
Department of Animal Science
Texas A & M University
College Station, TX 77843
Estados Unidos
w-ellis@tamu.edu

Gramíneas y Leguminosas Tropicales...Proyecto IP-5



Apartado Aéreo 6713
Cali, Colombia