

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

Diego Chamorro<sup>1</sup>,  
Juan Evangelista Carulla<sup>2</sup> y  
Pablo Cuesta<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Title: The relationship between histological structure and chemical composition in leaves of forage grasses and legumes**

A study was conducted to determine the relationship between histological structure and chemical composition in leaf blades of the forage grasses *Bouteloua repens* and *Bothriochloa pertusa* and of the legumes *Stylosanthes scabra*, *Desmodium barbatum* and *Tephrosia cinerea*. In grasses and during the dry season, sclerenchyma content of *B. pertusa* increased by 197.8%, and variation in this parameter explained 64% of the variation observed in *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD,  $P < 0,001$ ). In turn, *B. repens* exhibited the greater Kranz structure areas ( $P < 0,01$ ) with an average of 19,63%. The mesophyll area was greater in *B. pertusa* ( $P < 0,0001$ ) and it was observed that during the rainy season there was a rapid increase in degradable tissue content in this grass ( $P < 0,01$ ). In the dry season, crude protein (CP) content diminished in both *B. pertusa* and *B. repens* by 47,2% and 52,4%, respectively, and *B. repens* showed the lower CP content of both grasses (5,63%,  $P < 0,01$ ). In the rainy season, the neutral detergent fiber (NDF) content of *B. repens* (63,98%) surpassed that of *B. pertusa* (60,18%;  $P < 0,01$ ). An inverse relationship was observed between acid detergent fiber (ADF) and CP content ( $R^2 = -0,94\%$ ;  $P < 0,01$ ) in the grasses. In both seasons, *B. pertusa* had greater IVDMD than *B. repens* (72,82% and 69,86%, respectively;  $P < 0,01$ ), and this had a 0.94 correlation coefficient with both CP content and leaf mesophyll area ( $P < 0,001$ ). In both grasses, lignin content had a 0.89 correlation coefficient with the sclerenchyma area ( $P < 0,001$ ). Although it represents a small fraction of the leaf lamina, this tissue affected significantly the quality of grasses, having a 0.70 correlation coefficient with the effective dry matter degradability (EDMD;  $P < 0,001$ ). In the legumes the area of sclerenchyma was greater in *D. barbatum* at the beginning of drought (10,09%,  $P < 0,01$ ). The greater CP content was observed with *T. cinerea* with 20.52%, followed of *S. scabra* with 16.80% and *D. barbatum* with 12,52% ( $P < 0,001$ ); NDF was higher ( $P < 0,001$ ) in *D. barbatum* (38,14%) followed by *T. cinerea* (31,14%) and *S. scabra* (30,15%). In all periods evaluated, *T. cinerea* had the lowest ADF and lignin content ( $P < 0,001$ ), and this resulted in greater IVDMD (79,71%) and EDMD (52,36%) values ( $P < 0,001$ ). The area of rapidly degradable tissues of the legumes had an inverse relation with ADF and lignin content (74.7% and 95.3%;  $P < 0,01$ ). In turn, the area non-degradable tissue had a direct relation with the lignin content (correlation coefficient = 0.81). Both the sclerenchyma and xylem area had a significant impact on IVDMD (correlation coefficient = 0.975). In addition, variation in xylem area explained 92% of the variation in NDF content ( $P < 0,01$ ). The analysis of the histological structure showed to be a very useful tool on the processes of selection and management of forage species.

**Keywords:** plant histological structure, chemical composition, forage grasses and legumes.

Recibido: marzo 15 de 2005.  
Aceptado: mayo 2 de 2005.

1. Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, C.I. Tibaitatá. E-mail: dchamorro@corpoica.org.co  
2. Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

## Relaciones entre estructura histológica y composición química en hojas de gramíneas y leguminosas

## RESUMEN

Para determinar la relación entre estructura histológica y composición química se utilizaron láminas foliares de las gramíneas *Bouteloua repens* y *Bothriochloa pertusa* y foliolos de las leguminosas *Stylosanthes scabra*, *Desmodium barbatum* y *Tephrosia cinerea*. Con respecto a las gramíneas, en la estación seca *B. pertusa* incrementó 197,8% su esclerénquima, lo que explicó 64% de su DIVMS ( $P < 0,001$ ). *B. repens* exhibió mayores áreas kranz ( $P < 0,01$ ) con un promedio de 19,63%. El área del mesófilo en *B. pertusa* fue superior en 52,51% ( $P < 0,0001$ ) y se observó que las lluvias incrementaron los tejidos rápidamente degradables en 74,50% ( $P < 0,01$ ). En la estación seca la PC disminuyó en *B. pertusa* y *B. repens* en 47,2% y 52,4%, respectivamente; los menores porcentajes de PC los presentó *B. repens* con 5,63% ( $P < 0,01$ ). En la estación lluviosa la FDN de *B. repens* (63,98%) superó a *B. pertusa* (60,18%) ( $P < 0,01$ ). Se reporta una relación inversa entre la FDA y la PC ( $R^2 = -0,94\%$ ;  $P < 0,01$ ) en las gramíneas. En lluvia y en sequía *B. pertusa* presentó mayor DIVMS: 72,82% y 69,86% ( $P < 0,01$ ), lo que se explica en 94,2% por la PC y en 94% por el mesófilo ( $P < 0,001$ ). En *B. pertusa* y en *B. repens* la lignina explica en 89% ( $P < 0,001$ ) el área del esclerénquima; este tejido, aunque cubre áreas pequeñas de las láminas foliares, incidió directamente en la calidad de las gramíneas explicando 70% de la DEF ( $P < 0,001$ ). Por su parte, en las leguminosas el área de esclerénquima fue mayor en *D. barbatum* al inicio de sequía (10,09%,  $P < 0,01$ ). La mayor PC fue para *T. cinerea* con 20,52%, seguida de *S. scabra* con 16,80% y *D. barbatum* con 12,52% ( $P < 0,001$ ); la FDN fue mayor ( $P < 0,001$ ) en *D. barbatum* (38,14%) seguida por *T. cinerea* (31,14%) y *S. scabra* (30,15%). *T. cinerea* presentó en todos los períodos menores FDA y lignina ( $P < 0,001$ ), lo que se refleja en mayores porcentajes de DIVMS (79,71%) y DEF (52,36%) ( $P < 0,001$ ). Los tejidos rápidamente degradables de las leguminosas presentaron una relación inversa con FDA y lignina (74,7% y 95,3% respectivamente;  $P < 0,01$ ); los tejidos no degradables presentaron una relación directa con la lignina y ésta los explica en 81%. El esclerénquima y el xilema tienen un papel definitivo en la DIVMS y la explican en 97,5%; además, el xilema explica en 92% la FDN ( $P < 0,01$ ). El análisis de la estructura histológica es una herramienta muy útil para procesos de selección y manejo de especies forrajeras.

**Palabras claves:** estructura anatómica, composición química, gramíneas y leguminosas forrajeras.

## INTRODUCCIÓN

**H**AY EVIDENCIAS QUE la estructura histológica se relaciona con las características de degradación y el valor nutricional de las especies forrajeras como ha sido demostrado por Wilkinins (1972), Akin y Burdick (1975), Wilson (1976), Rodella *et al.* (1984), Ventrella *et al.* (1997ab) y Alves de Brito *et al.* (1997 y 1999). Se ha afirmado que las variaciones entre las estructuras anatómicas de gramíneas y leguminosas contribuyen a las diferencias observadas en la calidad de forraje (Akin y Burdick, 1975); además, la anatomía de la hoja influye, no sólo en la producción de forraje, sino que interviene sobre el

valor nutritivo y el desempeño animal (Paciullo *et al.*, 2002).

En el caso de los forrajes, la fracción potencialmente no degradable se ha caracterizado histológicamente utilizando técnicas de microscopía electrónica y de luz; así mismo, calculando la degradación de los tejidos con analizador de imágenes y enfocándose en los tejidos más lignificados: esclerénquima y xilema (Akin, 1989; Wilson, 1993 y Twidwell *et al.*, 1990).

Akin y Rigsby (1985) señalan que el mesófilo de todas las gramíneas ( $C_3$  y  $C_4$ ) es de rápida degradación por las bac-

terias ruminales sin requerir adhesión, debido a una acción enzimática extracelular, mientras que la epidermis y las vainas parenquimatosas requieren una íntima adhesión de las principales especies de bacterias celulolíticas; la resistencia de estos tejidos a la degradación se atribuye, tanto a su estructura anatómica, como a su composición química. La estructura histológica de las gramíneas de tipo  $C_4$  caracterizada por elevadas proporciones de haces vasculares, esclerénquima y vainas parenquimáticas de los haces, comprometen el valor nutritivo de estas plantas forrajeras (Wilson y Hatfield 1997).

La cuantificación del área ocupada por los diferentes tejidos en secciones de cortes transversales, a pesar de ser un buen indicador del valor nutricional, ignora las diferencias en la composición química y el grosor de la pared celular, situación que limita su valor como indicador del valor nutritivo (Wilson, 1993); por lo tanto, la determinación de la composición química de las láminas foliares y su relación con la proporción de tejidos complementa la información del valor nutritivo de los forrajes. Por lo tanto, se puede sugerir que el estudio de la estructura histológica de especies forrajeras permite identificar el grado de organización interna de los tejidos y clasificarlos según su degradabilidad ruminal. Consecuentemente, el análisis de la estructura anatómica es un buen indicador de la calidad de los forrajes, debido a que influyen directamente en la disponibilidad de los nutrientes para los microorganismos ruminales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura anatómica de las láminas foliares de *Bouteloua repens*, *Bothriochloa pertusa* y foliolos de *Stylosanthes scabra*, *Desmodium barbatum* y *Tephrosia cinerea* a fin de evaluar su relación con indicadores de calidad nutricional y épocas contrastantes de precipitación.

## Materiales y métodos

**Localización geográfica.** Esta investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Nataima de CORPOICA, ubicada en el municipio de El Espinal a 425 msnm, temperatura promedio de 28°C y 1.400 mm de precipitación. La recolección de muestras se realizó al inicio y al final de las estaciones de lluvia y sequía: la época de lluvia comprendió entre los meses de marzo a junio, con una precipitación total de 1.494 mm repartidos en 32 días. El periodo de evaluación en sequía estuvo comprendido entre julio y octubre, con una precipitación de 177 mm repartidos en 8 días.

**Sitio de recolección.** Las especies *Bouteloua repens*, *Bothriochloa pertusa*, *Stylosanthes scabra*, *Desmodium barbatum* y *Tephrosia cinerea* se recolectaron en la Hacienda Pacandé, localizada en el municipio de Saldaña con una altura de 420 msnm, temperatura promedio de 28°C y 1.250 mm de precipitación. Las muestras de láminas foliares y foliolos, así como las muestras de forraje para los análisis químicos, se recolectaron del tercio superior de 25 plantas representativas por periodo, provenientes de praderas de *Bouteloua repens* y *Bothriochloa pertusa* con 28 días de descanso, según la metodología planteada por Akin y Robinson (1982). Las leguminosas evaluadas se recolectaron de praderas de *B. repens* en donde conforman asociaciones naturales estables.

**Estructura anatómica.** Los fragmentos de hojas fueron fijados en una solución F.A.A. (formol, 10 ml; ácido acético glacial, 5 ml y etanol de 70%, 85 ml) (Jensen, 1962). Se seleccionaron por triplicado secciones de lámina foliar y foliolos por especie y por periodo. Para el procesamiento histológico de muestras se utilizaron los protocolos de microtécnica de vegetales del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia (Becerra et al., 2002) y la técnica descrita

por Twidwell et al. (1990). El protocolo en el procesamiento de los micropreparados de 10 micras contempló las fases de deshidratación, inhibición, infiltración, inclusión, corte y coloración.

**Deshidratación:** El material fijado en FAA y glutaraldehído al 5% se depositó en cassettes y se lavó con etanol al 70%; posteriormente se deshidrató con alcohol etílico en concentraciones de 30%, 50%, 70%, 90%, 95% y grado absoluto durante 90 minutos.

**Inhibición:** Se introdujeron los cassettes con las muestras de tejido en recipientes que contenían las diluciones de etanol absoluto más alcohol butírico terciario en la siguiente proporción (3:1; 3:2; 3:3; 2:3; 1:3) y luego en alcohol butílico terciario, con tres recambios de este alcohol.

**Infiltración:** Se agregó parafina de 55° a 58° de fusión y alcohol butílico terciario en proporción de 1:3. Posteriormente, se colocó en la estufa a 56°C y a partir de las 2 horas se adicionó parafina para mantener el volumen inicial perdido por la evaporación del alcohol, hasta que el material quedó en parafina pura.

**Inclusión:** Los segmentos de hoja se incluyeron en parafina mediante moldes con la orientación transversal formando bloques de parafina los cuales se solidificaron por congelación.

**Corte:** Se utilizó un micrótopo de rotación seccionando cortes transversales de 10 micras. Los cortes se colocaron sobre láminas porta objeto marcadas previamente con un lápiz de diamante e impregnadas con albúmina de Mayer; las preparaciones se secaron en estufa a 60°C durante 20 minutos antes de su tinción.

**Coloración:** Se utilizó la tinción de contraste safranina-fast green. Las modificaciones al procedimiento se muestran en la Figura 1.

**Análisis de imágenes.** Se realizó en el laboratorio de fisiología del postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria

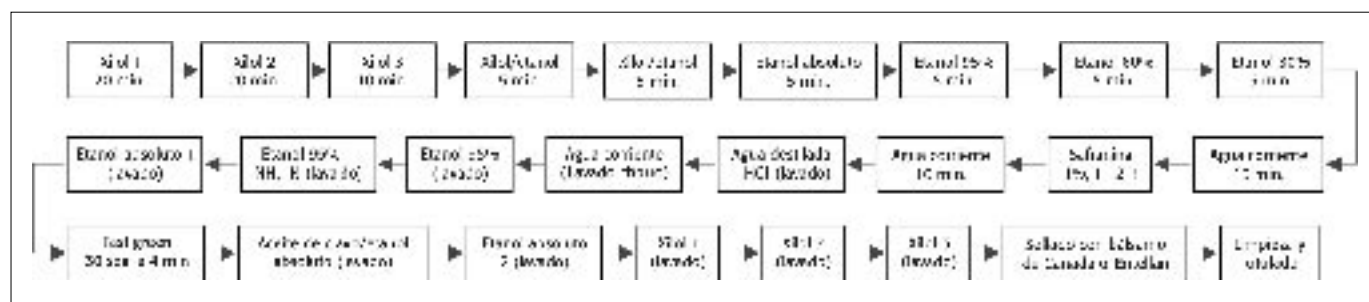


Figura 1. Proceso de preparación de micropreparados.

y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia; se cuantificaron los principales componentes de la estructura anatómica (floema, xilema, mesófilo, hidrénquima, estructura kranz, cubierta de los haces vasculares, epidermis, células buliformes y esclerénquima) utilizando técnicas de microscopía de luz. La técnica de medición y cuantificación de áreas de los tejidos se realizó mediante el empleo del método indirecto de lectura de imágenes utilizando un morfofisiómetro LECO-2000®.

En las gramíneas se digitalizaron los tejidos: esclerénquima, xilema, floema, kranz, células buliformes, epidermis adaxial, epidermis abaxial y mesófilo; en las leguminosas se digitalizó: esclerénquima, xilema, floema, hidrénquima, epidermis adaxial, epidermis abaxial, taninos y mesófilo. Los porcentajes de tejidos se determinaron en tres réplicas por especie forrajera, por época y período.

**Caracterización química.** Se determinó materia seca (MS), proteína cruda (PC N x 6,25), cenizas (AOAC, 1975) y para la cuantificación de pared, se utilizó el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991) determinando fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA). El porcentaje de lignina en las muestras se estableció por el método descrito por Van Soest y Wine (1968). Para la evaluación de la digestibilidad de la materia seca se utilizó el método *in vitro* de Tilley y Terry (1963). Para el cálculo de la degradabilidad efectiva se utilizó el modelo no lineal descrito por Ørskov y McDonald (1979). Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Nutrición Animal del C.I. Tibaitatá de CORPOICA.

**Análisis estadístico.** Para definir el número de hojas a analizar y cuantificar el área de tejidos en láminas foliares de gramíneas y foliolos de leguminosas se realizó una prueba de homogeneidad.

En el análisis de la estructura anatómica se utilizó un diseño completamente al azar, con igual número de unidades experimentales, donde los tratamientos estuvieron constituidos por el factorial de especies por épocas y periodos de muestreo; además, se realizaron ecuaciones de regresión para evaluar la interdependencia entre la estructura anatómica y la composición química.

Cuantificada el área de los tejidos, los datos fueron sometidos al análisis de varianza por SAS® (1998). Para las varia-

ciones en las proporciones de tejidos de la lamina foliar y foliolos y las interacciones se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + I_j + C_k + EI_{ij} + EC_{ik} + IC_{jk} + EIC_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = valor de  $l^{\text{a}}$  observación, relativa a  $k^{\text{a}}$  época del año, el  $j^{\text{a}}$  período; la  $i^{\text{a}}$  especie;

$\mu$  = media general;

$E_i$  = efecto de la  $i^{\text{a}}$  especie, siendo  $i = 1, 2$  (gramíneas)  $i = 1, 2, 3$  (leguminosas);

$I_j$  = efecto del  $j^{\text{a}}$  periodo, siendo  $j = 1, 2$ ;

$C_k$  = efecto de la  $k^{\text{a}}$  época, siendo  $k = 1, 2$ ;

$EI_{ij}$  = interacción de los efectos de la  $i^{\text{a}}$  especie con el  $j^{\text{a}}$  período;

$EC_{ik}$  = interacción de los efectos de la  $i^{\text{a}}$  especie con la  $k^{\text{a}}$  época;

$IC_{jk}$  = interacción de los efectos del  $j^{\text{a}}$  periodo con la  $k^{\text{a}}$  época;

$EIC_{ijk}$  = interacción de los efectos de la  $i^{\text{a}}$  especie con el  $j^{\text{a}}$  periodos con la  $k^{\text{a}}$  época; y

$e_{ijkl}$  = error aleatorio asociado con cada observación.

## Resultados y discusión

### Prueba de homogeneidad

En *B. pertusa* se digitalizaron 3 hojas, 5 secciones y 8 tejidos y no se encontraron diferencias entre hojas para todos los tejidos ( $P > 0,05$ ); el esclerénquima y el floema fueron similares en secciones de las hojas ( $P > 0,05$ ), el efecto de las secciones sobre el área fue significativo en todos los demás tejidos ( $P < 0,01$ ). En *B. repens* se encontró que para esclerénquima, xilema, floema, área kranz, epidermis adaxial, epidermis abaxial, mesófilo y células buliformes, el porcentaje del área no fluctuó entre hojas ( $P > 0,05$ ) ni entre secciones ( $P > 0,05$ ); pero en el caso de epidermis abaxial, mesófilo y células buliformes se encontraron diferencias entre las secciones ( $P < 0,001$ ).

En la leguminosa *T. cinerea* se reportó que para esclerénquima, xilema, floema, hidrénquima y mesófilo, el efecto de hoja y sección sobre el área fue similar ( $P > 0,05$ ); en los otros tejidos los porcentajes variaron con las secciones ( $P < 0,001$ ). Un patrón semejante al de *T. cinerea* exhibió la especie *S. scabra*. La leguminosa *D. barbatum* presentó la mayor homogeneidad estructural, pues se analizaron 3 hojas, 9 secciones y 8 tejidos, el porcentaje del área de los tejidos no cambio entre hojas y entre secciones ( $P > 0,05$ ).

Metodológicamente, lo anterior permite recomendar que para cuantificar tejidos en láminas foliares de las especies forrajeras estudiadas, basta la lectura de  $\frac{1}{2}$  lámina foliar como representativa de

la estructura histológica, sumando el área de los tejidos en cada sección y teniendo en cuenta la mitad de la nervadura central. Ninguna sección de las láminas foliares, tanto en las gramíneas como en las leguminosas estudiadas, fue representativa de la conformación anatómica de la lámina foliar.

### Análisis de la estructura histológica de las gramíneas

Como se observa en la Tabla 1 (página siguiente), los tejidos foliares de las especies forrajeras difieren en su estructura interna y las diferencias están relacionadas con los grupos taxonómicos y el efecto de la precipitación (época) o del período dentro de cada época (Figuras 2 y 3, página siguiente).

Existen criterios anatómicos para clasificar las gramíneas  $C_4$  según las tres rutas fotosintéticas (Laetsch, 1974; Hattersley y Watson 1976; Edwards y Huber, 1981). Así, la especie *B. repens*, por presentar mestoma, tener cloroplastos con grana en disposición centrífuga, se clasifica en la ruta PEP-CK; la especie *B. pertusa*, por poseer cloroplastos en disposición centrífuga, agranales y sin presencia de mestoma, se clasificó dentro de la ruta NADP-ME.

**Tejidos rápidamente degradables.** El comportamiento del área de tejidos rápidamente degradables, conformado por mesófilo, floema y células buliformes, fue significativamente superior en la especie *B. pertusa* que *B. repens* con áreas promedio de 74,50%, 69,57% y 56,91%, 56,52% para las épocas de lluvia y sequía, respectivamente ( $P < 0,001$ ). En *B. pertusa* la disponibilidad de agua incrementó el área de los tejidos rápidamente degradables ( $P < 0,01$ ) y superó el promedio de la época de sequía con un valor de 74,50%.

Para las proporciones del área del floema, el análisis de varianza muestra efectos debidos a la especie ( $P < 0,01$ ), la época ( $P < 0,001$ ) y la interacción especie x época ( $P < 0,001$ ) con diferencias significativas; sin embargo, no se presentaron diferencias en la interacción especie x periodo dentro de cada época. Así, se demostró que el floema es un tejido influido por la disponibilidad de agua, que no cambia sus áreas en periodos cortos de tiempo y que la respuesta depende más de cada especie. Los valores del floema encontrados en esta investigación, son similares a los reportados por Akin (1989) el cual obtuvo valores de 3% en *Bothriochloa caucásica*. De igual manera, Akin y Burdick (1975) reportaron

**Tabla 1.** Promedios de áreas de tejidos en láminas foliares de *B. pertusa* y *B. repens* en cuatro periodos contrastantes de precipitación.

Tratamientos	<i>Bothriochloa pertusa</i>				<i>Bouteloua repens</i>				Fuentes de variación				
Época	Lluvia		Sequía		Lluvia		Sequía		Especie	Época	Periodo (Época)	Especie * Época	Especie * Periodo (Época)
Periodos	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final					
Tejidos	%												
Esclerénquima	0.64	0.74	1.29	2.82	3.95	3.88	3.49	5.56	***	*	ns	*	ns
Xilema	4.86	5.78	5.18	5.33	3.74	8.38	5.34	9.39	*	*	*	*	***
Floema	2.0	2.2	1.98	2.38	3.13	2.53	1.79	2.10	ns	*	*	ns	ns
Kranz	7.7	6.27	9.35	9.50	22.19	19.29	20.67	16.38	***	ns	***	**	**
Cel. buliformes	15.2	15.89	16.73	21.67	18.08	18.39	22.85	20.75	*	*	ns	ns	****
Epidermis abaxial	3.93	3.75	3.40	3.56	7.94	4.33	3.16	4.47	**	**	**	**	**
Epidermis Adaxial	8.88	8.40	10.12	10.30	4.16	8.30	8.45	10.04	**	**	*	**	**
Mesófilo	55.6	57.03	51.93	44.43	36.8	34.88	34.25	31.31	***	**	ns	ns	ns
Tejidos agrupados	%												
TRD	73.9	75.08	70.65	68.49	58.01	55.80	58.88	54.15	***	**	**	**	ns
TLD	12.8	12.16	13.52	13.86	12.10	12.64	11.61	14.51	ns	ns	ns	ns	ns
TND	13.28	12.76	15.83	17.65	29.87	31.55	29.50	31.34	***	**	****	*	ns
Areas	μ <sup>2</sup>												
Area campo	531.7	542.9	538.7	511.0	334.8	371.0	474.4	391.8	**	ns	ns	ns	ns
Area total corte	2658.7	2171.8	2154.9	2044.9	1004.5	1113.1	940.79	783.6	***	**	ns	ns	ns

\*= Diferencias significativas (P<0,05); \*\*= Diferencias significativas (P<0,01); \*\*\*= Diferencias altamente significativas (P<0,001); ns= Diferencias no significativas (P>0,05). TRD: Tejidos rápidamente degradables; TLD: Tejidos lentamente degradables; TND: Tejidos no degradables.

promedios para *P. notatum*, *P. dilatatum* y *D. decumbens* entre 1,4 y 4,0%.

El área del floema en *B. repens* superó (P<0,05) a *B. pertusa* en la época de lluvia, contrario a la época de sequía en donde los promedios fueron similares (P>0,05) en las dos gramíneas. Estos resultados se asemejan a los reportados por Queiroz *et al.* (2000) en *Pennisetum purpureum*, *Setaria anceps* y *Hyparrhenia rufa* (2,5, 2,1 y 4,1% respectivamente). Así mismo, Akin (1989) reportó un promedio de 2% para el floema en las especies *Cynon dactylon*, *Sorghum bicolor*, *Paspalum notatum*, *Paspalum dilatatum*, *Digitaria decumbens*, *Digitaria sanguinalis*, *Digitaria pentzii*, *Bothriochloa caucasica* y *Panicum maximun*, valores similares a los obtenidos en *B. repens* y *B. pertusa*.

En las células buliformes, *B. repens* obtuvo las mayores áreas para la época inicio de sequía (20,84%) comparado con *B. pertusa* (16,73%). La especie *B. pertusa* cambió los patrones de este tejido entre épocas (P<0,05) presentando mayores porcentajes en sequía (P<0,05), situación que no se presentó en *B. repens* entre periodos dentro de épocas (P>0,05). En esta investigación los promedios de área

de este tejido en *B. repens* (20,01%) fueron superiores a los encontrados en *B. pertusa* (17,37%) (P<0,01) y los valores promedios en sequía (20,50%) fueron superiores a los reportados en lluvias (P<0,01), posiblemente asociado a la respuesta de la especie al déficit hídrico.

El promedio del área de mesófilo en *B. pertusa* presentó más de la mitad del área de las láminas foliares (52,51%), superando estadísticamente a los valores de *B. repens* (34,31%) (P<0,0001). Es importante anotar, que en la especie *B. pertusa* la pérdida del área del mesófilo por efecto de disponibilidad de agua fue mayor que en *B. repens* con valores de 14,5% y 8,% respectivamente. Los porcentajes de mesófilo reportados por Akin (1989) en *Bothriochloa caucasica* (31%) son similares a los valores de *B. repens* (34,31%), pero son muy inferiores a los de *B. pertusa* (52,26%). Este mismo autor, promediando las áreas de 9 especies C<sub>4</sub>, reportó una media de 38% para el área del mesófilo. De igual manera, Flores *et al.* (1993) obtuvieron valores promedios de 46,8% para *P. purpureum* y *P. notatum*; por su parte Wilson y Hatterley (1989) evaluando 18 gramíneas C<sub>4</sub>

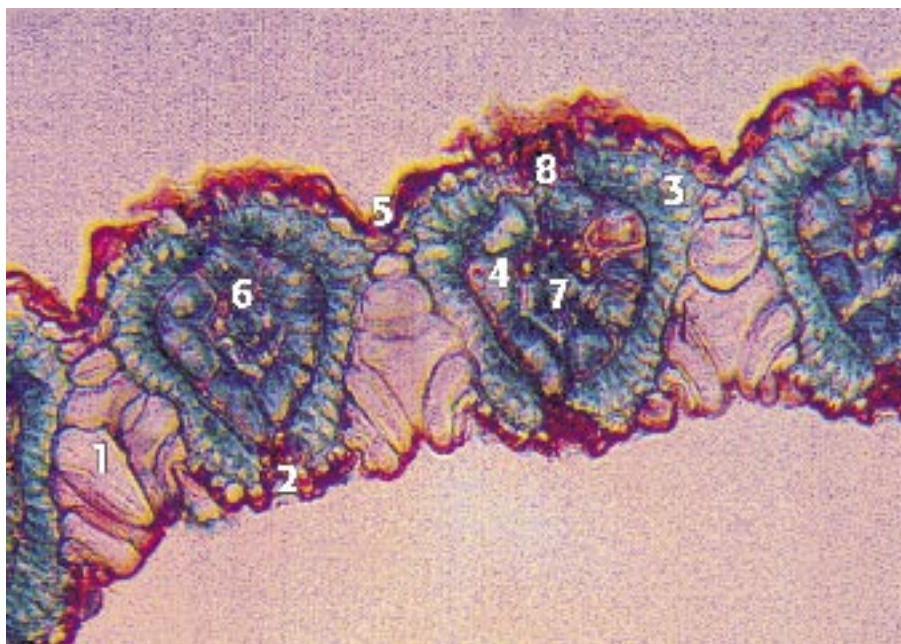
y seis gramíneas C<sub>3</sub>, obtuvieron promedios de 39%.

El análisis de varianza muestra que para el área de los tejidos rápidamente degradables, los efectos de la especie (P<0,001), época (P<0,01), período dentro de época (P<0,01) y la interacción especie por época (P<0,01), presentaron diferencias significativas. *B. pertusa* presentó mayores áreas tanto en lluvia como en sequía (P<0,01), las áreas cubiertas representan el 72,03% y el 56,71% de las láminas foliares en *B. pertusa* y *B. repens*. Es de anotar que la mayor área en los tejidos rápidamente degradables se presentó en *B. pertusa* en la época de lluvia con un valor promedio de 74,50% y descendió en la época de sequía en un 6,6%, situación contraria se obtuvo en *B. repens* que presentó sólo una disminución del 0,7%.

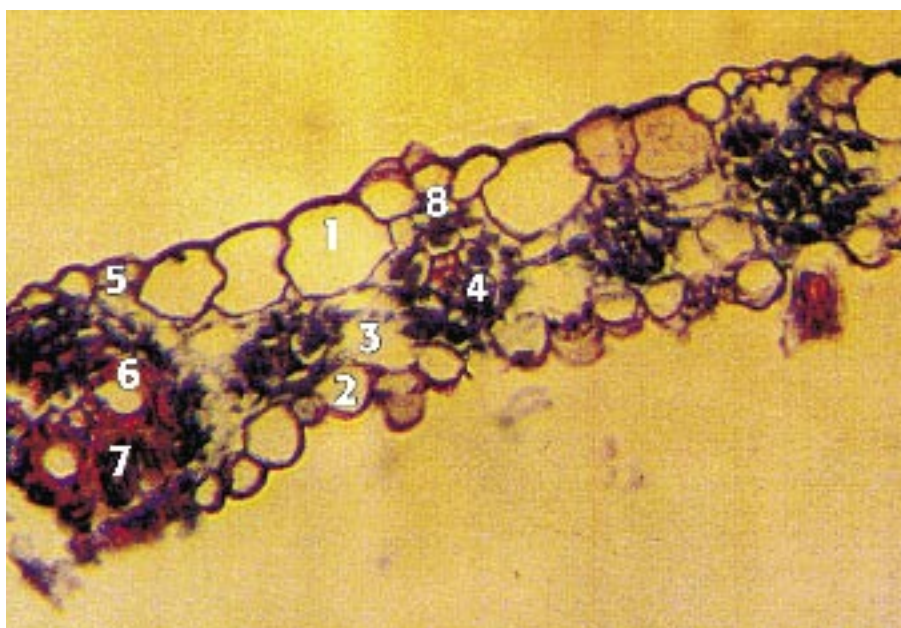
*Tejidos lentamente degradables.* El perfil histológico de los tejidos lentamente degradables estuvo conformado por las epidermis adaxial y abaxial.

Para el área de la epidermis abaxial los promedios indican que las mayores áreas se presentaron en *B. repens* en las épocas de lluvia 6,14% y sequía 3,82%.





**Figura 2.** Corte transversal de la lámina foliar de *B. repens* en época de lluvia. 1. Células buliformes; 2. Epidermis abaxial; 3. Mesófilo; 4. Estructura kranz; 5. Epidermis adaxial; 6. Xilema; 7. Floema; 8. Esclerénquima.



**Figura 3.** Corte transversal de la lámina foliar de *B. pertusa* en época de lluvia. 1. Células buliformes; 2. Epidermis abaxial; 3. Mesófilo; 4. Estructura kranz; 5. Epidermis adaxial; 6. Xilema; 7. Floema; 8. Esclerénquima.

Valores inferiores a los reportados por Akin y Burdick (1975), con promedios entre 8,3% y 12,2% en *P. notatum*, *P. dilatatum* y *D. decumbens*. Los promedios en el área de epidermis abaxial por efecto de la menor disponibilidad de agua disminuyeron en las dos gramíneas, aunque este descenso fue más notorio en *B. repens* con valores de 37,8% comparado con sólo un 4,6% en *B. pertusa*.

En época de sequía los promedios fueron superiores en el área de la epidermis adaxial; así, *B. pertusa* superó con un valor de 10,21% al promedio de la época de lluvia 8,64% ( $P < 0,05$ ); de igual manera, el área de epidermis adaxial de *B. repens* en sequía (9,25%) superó al valor presentado en lluvia 6,24% ( $P < 0,01$ ), valores inferiores a los reportados por Akin y Burdick (1975) quienes obtuvie-

ron promedios que oscilaron entre 15,8% y 36,2% para *P. notatum*, *P. dilatatum* y *D. decumbens*.

Es de anotar, que en el período final de sequía existió una tendencia a incrementar el área de epidermis adaxial (10,30% y 10,04%) para *B. pertusa* y *B. repens*, respectivamente. Los valores encontrados en esta investigación son inferiores a los reportados por Akin (1989) quien obtuvo valores de 42% en la suma de las epidermis en *B. caucasica*.

Las epidermis de las gramíneas evaluadas presentaron paredes gruesas y con presencia de cutícula. En *B. pertusa* las células de las epidermis adaxial fueron de gran tamaño.

La cutícula de la epidermis adaxial presenta mayor resistencia a la digestión por ser cutinizada y lignificada, aunque la composición de la pared celular interna equivale al mesófilo (Chesson *et al.*, 1986), siendo rápidamente digerida (Hanna *et al.*, 1973). Wilson *et al.* (1991) verificaron porcentajes de digestión muy similares entre la epidermis y el mesófilo en secciones transversales de *P. maximum* y *C. dactylon* incubadas *in vitro*. Akin (1989) reportó un promedio de 35% para el área total de las dos epidermis en *C. dactylon*, *S. bicolor*, *P. notatum*, *P. dilatatum*, *D. decumbens*, *D. sanguinalis*, *D. pentzii*, *B. caucasica* y *P. maximum* valores superiores a los obtenidos en *B. repens* (12,72%) y *B. pertusa* (13,16%).

En esta investigación se presentaron diferencias significativas entre épocas ( $P < 0,05$ ); la época de sequía con 13,37% superó el área de los tejidos lentamente degradables de la época de lluvia (12,42%). En estos tejidos no se presentaron interacciones entre las gramíneas evaluadas con la época ( $P > 0,51$ ) ni los períodos ( $P > 0,12$ ), lo que indica que los factores principales actúan de forma independiente. Estos resultados son menores a los reportados por Flores *et al.* (1993) en *P. purpureum* y *P. notatum*, con promedios de 25,9% y 32,7%; de igual manera, con los reportes de Queiroz *et al.* (2000) en *P. purpureum*, *S. anceps* y *H. rufa* con valores de 33,9, 49 y 34,2%, respectivamente. Wilson y Hatterley (1989) evaluaron 18 gramíneas  $C_4$  y 6 gramíneas  $C_3$ , obtuvieron promedios de 28,6% en las  $C_4$  y 21,5% en las  $C_3$ , superiores que *B. pertusa* y *B. repens*.

*Tejidos no degradables:* Para la evaluación de los tejidos no degradables se tuvo en cuenta las áreas de esclerénquima, de xilema y la estructura kranz. Los promedios de esclerénquima muestran

que *B. repens* (4,22%) superó a *B. pertusa* (1,37%) ( $P < 0,01$ ); así mismo, los valores del esclerénquima en la época de mínima precipitación 3,29% superaron a los encontrados en el periodo de máxima precipitación 2,30%. Akin (1989) reporta valores del esclerénquima en *B. caucásica* (4%) similares a *B. repens* y superiores a *B. pertusa*, siendo este valor similar a los reportados por Queiroz *et al.* (2000) en *P. purpureum*, *S. anceps* y *H. rufa* (1,7, 2,1 y 2,4 % respectivamente); Flores *et al.* (1993) con *P. purpureum* (1,55%) y de *B. decumbens* (1,4%) obtenido por Wilson y Hatterley (1989).

El efecto de la menor disponibilidad de agua repercutió en la especie *B. pertusa* en un marcado incremento en el área de esclerénquima, superior al que se obtuvo con *B. repens* con valores del 197,8% y 15,6%. Característica que disminuye el valor nutritivo al crear una barrera a la colonización y a la acción de las enzimas microbianas (Wilson y Mertens 1995). Akin (1989), reporta un promedio del 6% para el esclerénquima en nueve gramíneas  $C_v$  al igual que Flores *et al.* (1993) para *P. notatum* (5,4%) valores estos similares al obtenido en *B. repens*.

Para el área del xilema, los cuadrados medios del análisis de varianza muestran que hubo efectos asociados a la especie, la época, el período dentro de época, las interacciones especie x época y especie x periodo dentro de época, con diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ), lo cual indica que el xilema es un tejido muy sensible a los cambios climáticos y que el efecto de estos cambios dependen de la especie. El promedio del área del xilema en *B. pertusa* (5,27%) es menor a los reportes de Akin (1989) de 7% en *B. caucásica* y a los de Queiroz *et al.* (2000) en *P. purpureum* y *H. rufa* (6,9 y 7,4%) y al de *B. decumbens* (6,4%) obtenido por Wilson y Hatterley (1989). Aunque se ha propuesto que posiblemente el xilema mantiene sus porcentajes en las gramíneas  $C_v$  en esta investigación se encontraron diferencias entre especies.

En la estructura kranz, las mayores áreas las presentó *B. repens* (20,74% y 18,53%) para lluvia y sequía, comparado con *B. pertusa* (7,03% y 9,43%) ( $P < 0,01$ ). De igual manera, las áreas kranz en *B. repens* fueron mayores en lluvia ( $P < 0,01$ ), lo que no sucedió con *B. pertusa* la cual presentó la mayor área en sequía ( $P < 0,01$ ). Los valores encontrados en *B. pertusa* son menores al 13% reportado en *B. caucásica* por Akin (1989) y similares a *B. repens*. Flores *et*

*al.* (1993) obtuvieron 20,5% y 20,2% para *P. purpureum*, *P. notatum* y *B. decumbens*, mientras Wilson y Hatterley (1989) en *P. maximum* lograron valores de 29,3% y 25,1% similares a *B. repens*.

Aunque en el tipo *Panicoides*, habitualmente sólo existe la capa de células de kranz, en esta investigación se evidenció en *B. repens* la presencia de dos capas concéntricas en la vaina: una interna o mestoma y otra parenquimática con cloroplastos. Las células de la estructura kranz en *B. repens* presentaron paredes celulares muy gruesas con un incremento en el área del 11,42% con respecto a *B. pertusa*.

El área de los tejidos no degradables fue superior ( $P < 0,01$ ) en *B. repens* que en *B. pertusa*, tanto en la época de lluvia como en sequía, con valores de 30,72%, 30,42% y 13,02%, 16,74%, respectivamente.

De igual manera, se presentó interacción entre especies x época ( $P < 0,01$ ), observándose en *B. pertusa* que los tejidos no degradables se incrementaron en la época de sequía en 28,6 unidades porcentuales, situación que no se presentó en *B. repens* especie que mantuvo altos valores en las dos épocas (30,72% en sequía y 30,42% en lluvia); esto es una característica indeseable en especies forrajeras, debido a que existe una asociación positiva de estos tejidos con las fracciones lentamente degradables y los niveles de lignina (Akin, 1989; Wilson, 1983). De igual manera, si las cantidades de tejidos vasculares lignificados y esclerenquimáticos son mayores, se ocasiona una menor tasa de digestibilidad (Wilkins, 1972; Wilson, 1976; Rodella *et al.*, 1982).

**Área total de la lámina foliar.** El análisis de varianza para el área total de la lámina foliar señaló diferencias altamente significativas por efecto de la especie y de la época ( $P < 0,01$ ). En este variable no se presentaron interacciones entre las gramíneas evaluadas con la época, ni en los periodos dentro de época.

El área total de las láminas foliares de *B. pertusa* medida en  $\mu^2$  fue de 2.257,43  $\mu^2$  superior ( $P < 0,0001$ ) que el área de *B. repens*, con un promedio de 960,53  $\mu^2$ . Las áreas totales en *B. pertusa*, tanto en lluvia como en sequía, superaron a las áreas reportadas por *B. repens* ( $P < 0,01$ ). El valor promedio para la época de lluvia en las gramíneas fue de 1.737,06  $\mu^2$  y en sequía de 1.480,90  $\mu^2$ . En *B. pertusa* los promedios del área total fueron mayores en la época de lluvia que en sequía con valores de 2.415,26  $\mu^2$  y 2.099,59  $\mu^2$

( $P < 0,01$ ). Esta situación no se presentó en *B. repens*, especie que conservó el área total durante las épocas con valores de 1.058,86  $\mu^2$  y 862,21  $\mu^2$  ( $P > 0,05$ ).

#### **Análisis químico de las láminas foliares de gramíneas**

En la Tabla 2, se muestran los promedios obtenidos en la composición nutricional de las gramíneas evaluadas.

**Proteína cruda (PC).** El análisis de varianza muestra que los efectos época ( $P < 0,001$ ), período dentro de época ( $P < 0,001$ ) y la interacción especie x época ( $P < 0,01$ ) presentaron diferencias altamente significativas. De igual manera, el efecto de la especie y la interacción especie por periodo dentro de época. Los porcentajes de proteína fueron comparables entre sí ( $P > 0,05$ ) para *B. pertusa* y *B. repens*, con valores de 8,78% y 8,71% respectivamente.

En las dos especies los valores de PC en la época de lluvia fueron mayores que en sequía con promedios de 11,64% y 5,82% respectivamente ( $P < 0,01$ ). En la época de lluvia, los contenidos de PC en *B. pertusa* (11,49%) superaron los promedios de *B. repens* en sequía (5,63%) ( $P < 0,01$ ). De igual manera, el contenido de PC de *B. repens* en la época de lluvia 11,81% superó al promedio de *B. pertusa* en la época de sequía 6,07% ( $P < 0,01$ ). Valores promedios en lluvia de las dos gramíneas fueron similares a los reportados por Akin *et al.* (1977) en láminas foliares de *C. dactylon* con 11,09%.

Los porcentajes de PC de la época de lluvia decaen marcadamente en la época de sequía, principalmente en la especie *B. repens* con pérdidas de 52,37% comparado con 47,25% en *B. pertusa*. Este comportamiento puede estar ligado con la relación que existe entre el contenido de PC y el porcentaje de fibra en detergente neutro (FDN), el cual explica en 72,2% el porcentaje de PC ( $P < 0,01$ ).

Tanto en *B. repens* como en *B. pertusa* esta relación ascendió a 85,3% ( $P < 0,01$ ) y 97,2% ( $P < 0,01$ ) respectivamente. El contenido de la PC de las láminas foliares es superior al análisis de las hojas completas (lámina foliar y vaina foliar) (Minson, 1990). Así, los resultados obtenidos en *B. pertusa* son superiores a los encontrados por Chamorro *et al.* (2002) quienes reportan porcentajes de PC de 3,8% en monocultivo y de 6,0% en asocio con *L. leucocephala*, y a los reportes de Sierra *et al.* (1986) con 8,3% de PC.

**Fibra en detergente neutro (FDN).** Los cuadrados medios del análisis de varian-

**Tabla 2.** Composición química de láminas foliares de *B. pertusa* y *B. repens*.

Composición química	<i>B. pertusa</i>				<i>B. repens</i>				Fuentes de variación				
	Lluvia		Sequía		Lluvia		Sequía		Especie	Época	Especie * Época	Período (Época)	Especie* Período (Época)
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final					
	%												
PC	13.4	9.5	7.1	5.0	14.0	9.53	6.8	4.4	ns	***	*	***	ns
FDN	58.6	61.7	65.9	67.8	62.7	65.2	65.7	67.2	**	**	**	**	ns
FDA	24.9	27.7	28.4	31.5	28.5	28.8	29.4	31.9	**	***	**	***	**
LIGNINA	3.7	3.9	4.0	4.7	3.5	5.4	5.2	5.3	**	**	ns	**	**
DIVMS	73.2	74.4	71.6	67.4	68.1	61.5	51.1	48.3	***	**	**	**	ns
DEF	48.3	41.3	40.1	38.5	37.7	39.2	37.1	28.4	***	***	ns	**	**

\*= Diferencias significativas ( $P<0,05$ ); \*\*= Diferencias significativas ( $P<0,01$ ); \*\*\*= Diferencias altamente significativas ( $P<0,001$ ); ns= Diferencias no significativas ( $P>0,05$ ).  
DEF: degradabilidad efectiva.

za muestran que los efectos de la especie ( $P<0,01$ ), época ( $P<0,001$ ), período dentro de época ( $P<0,01$ ) y las interacciones de la especie x época ( $P<0,001$ ) presentaron diferencias significativas sobre el FDN. Los mayores contenidos de FDN los presentó *B. repens* ( $P<0,05$ ), en la época de sequía (66,49%).

Es de resaltar que los promedios de FDN de *B. repens* en lluvia (63,98%) superan ( $P<0,01$ ) a los porcentajes de FDN de *B. pertusa* (60,18%). Adicionalmente, estos valores se incrementaron por efecto de la menor disponibilidad de agua en mayor grado en *B. pertusa* que en *B. repens* con incrementos de 10% y 3,77% respectivamente, no reportándose diferencias entre especies ( $P>0,05$ ) para los promedios de FDN en la época seca. Estos valores superan a los reportados por Wilson y Hattersley (1989), quienes encontraron para gramíneas  $C_4$  PCK un valor de 48,45% y para  $C_4$  NADP-ME promedios de 55,3%.

**Fibra en detergente ácido (FDA).** En la época de lluvia *B. pertusa* presentó los menores porcentajes al inicio de lluvias 24,99% que al final de lluvia 27,78% ( $P<0,1$ ), situación que no se presentó en *B. repens* especie que mantuvo sus valores entre los periodos de inicio y final de lluvia con promedios de 28,52% y 28,82% respectivamente ( $P>0,05$ ); sin embargo, los promedios de inicio y final de lluvia en *B. repens* fueron mayores ( $P<0,01$ ) a los reportados por *B. pertusa*. Los valores promedios en lluvia de las dos gramíneas fueron similares a los de Akin et al. (1977) en láminas foliares de *C. dactylon* con 30,6%.

Los porcentajes de FDA en sequía para *B. pertusa* y *B. repens* fueron mayores al final de la sequía con valores de 31,55% y 31,90% comparados con el inicio de sequía (28,49% y 29,43% respectivamente;  $P<0,01$ ). Es importante anotar que el porcentaje de FDA en *B. repens* al final de sequía (31,90%) superó los valores reportados al inicio y final de lluvias e inicio de sequía de las dos especies ( $P<0,01$ ). Los resultados en *B. pertusa* son menores a los encontrados por Chamorro et al. (2002) con promedios de 36,3% y 33,9% en monocultivo y en asocio con *L. leucocephala*.

**Lignina.** La interacción especie x período dentro de época muestran que los valores de lignina al inicio de las lluvias presentaron similitud entre las dos gramíneas ( $P>0,05$ ) y fueron mayores al final de lluvia tanto en *B. pertusa* como en *B. repens*, con valores de 3,96%, 3,70%, 5,98% y 3,50% respectivamente ( $P<0,01$ ). De igual manera, en la lignina ( $P<0,01$ ) se observaron mayores valores al inicio y final de sequía en *B. repens* que en *B. pertusa*. En *B. repens*, durante el inicio y final de la época de sequía, los valores de lignina (5,29% y 5,23%) fueron similares ( $P>0,05$ ). Los promedios obtenidos en las dos gramíneas fueron superiores a los reportados por Akin et al. (1977) en láminas foliares de *C. dactylon* con 2,6%.

Es necesario anotar que la menor disponibilidad de agua incrementó los porcentajes de lignina en las dos gramíneas, presentándose un mayor efecto en *B. repens* con un aumento del 15,28%. En *B. pertusa* y *B. repens* existe una relación inversa entre el contenido de FDA y el porcentaje de proteína cruda, la cual

está determinada en un 93,7% por el FDA ( $P<0,01$ ). Estos resultados en *B. pertusa* son menores a los encontrados por Chamorro et al. (2002) quienes reportan valores de 6,5% y 6,1% en monocultivo y en asocio con *L. leucocephala*.

**Digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS).** En la interacción especie x época se señala que los mayores porcentajes de DIVMS de láminas foliares, se obtuvieron para la especie *B. pertusa* ( $P<0,01$ ), tanto en lluvia como en sequía, con porcentajes de 73,82% y 69,54%, valores superiores a los encontrados en *B. repens* en lluvia y sequía ( $P<0,01$ ). Estos resultados se asemejan a los reportados por Queiros et al. (2000) quienes lograron valores de DIVMS de 72,1% en láminas foliares de *P. purpureum*; de igual manera, los promedios de *B. repens* son similares a los obtenidos por Wilson y Hattersley (1989), quienes reportan en gramíneas  $C_4$  PCK valores de 68,3%.

Al comparar la DIVMS de las épocas de lluvia y sequía, los porcentajes fueron superiores en lluvia, tanto en *B. pertusa* ( $P<0,05$ ) como en *B. repens* ( $P<0,01$ ). La especie *B. pertusa* superó ( $P<0,01$ ) los promedios de *B. repens* en lluvia (73,82%) como en sequía (69,54%); de igual manera, los valores de DIVMS de *B. pertusa* en la época de lluvia son mayores que los promedios en sequía ( $P<0,01$ ). Los porcentajes promedios de DIVMS de *B. pertusa* y *B. repens* en la época de lluvia son superiores a los reportados por Akin et al. (1973) en *C. dactylon* (59,1%) y similares a los de *F. arundinacea* con 68,5%.

Es importante señalar que existe una relación directa entre la disponibilidad de agua y la DIVMS para las dos gramíneas,

pues los valores promedio en *B. repens* para la época de lluvia decrecen marcadamente en 23,34% en la época de sequía, situación que no ocurre en *B. pertusa* especie que desciende ligeramente en sus porcentajes de DIVMS con 5,79%.

Wilson (1976) observó una disminución entre 12 y 19 unidades porcentuales de la digestibilidad de hojas de *Panicum maximum* var. Trichoglume en época de sequía; según este autor, la lignificación de las fibras esclerenquimáticas, el engrosamiento de la cutícula y la mayor exposición de la hoja a la atmósfera, explican esta disminución.

Existe una relación íntima entre el contenido de proteína cruda y la DIVMS; así, en *B. repens* y *B. pertusa* el porcentaje de DIVMS está explicado en 94,2% ( $P<0,01$ ) y 63,6% ( $P<0,01$ ) por el contenido de proteína. Por otra parte, la lignina influye en forma negativa sobre los valores de DIVMS y la explica en 64,8% ( $P<0,01$ ) por el porcentaje de lignina; de igual manera, el FDA define en *B. pertusa* y *B. repens* el 79,2% y 65,4% ( $P<0,01$ ) de la DIVMS.

*Degradabilidad efectiva de la materia seca (DEF)*. El análisis de varianza muestra que los efectos de la especie, época, período dentro de época y las interacciones entre especie x período dentro de época, presentan diferencias altamente significativas ( $P<0,001$ ) sobre la DEF de las láminas foliares en las gramíneas. En la interacción especie x períodos dentro de época, los promedios muestran que *B. pertusa* presentó los mayores porcentajes de DEF ( $P<0,05$ ) con valores de 48,34%, 41,40%, 40,10% y 38,51%, para los períodos de inicio ( $P<0,01$ ) y final de lluvia e inicio ( $P<0,01$ ) y final de sequía ( $P<0,01$ ), respectivamente.

En *B. pertusa* los promedios de DEF al inicio de lluvias superaron los valores del final de lluvias ( $P<0,01$ ), situación que no se presentó en *B. repens* en la cual los promedios del final de lluvia fueron superiores al inicio de lluvia ( $P<0,05$ ). Los valores de *B. repens* al inicio de sequía (37,19%) fueron superiores ( $P<0,01$ ) a los valores de final de sequía (28,44%), relación que se mantiene en *B. pertusa* la cual presentó también mayores porcentajes ( $P<0,05$ ) de DEF al inicio que al final de la sequía con 40,10% y 38,51%, respectivamente.

En esta investigación se observó que la DEF de las láminas foliares de las gramíneas está influida directamente por la disponibilidad de agua y se presentó una disminución de 17,22% y 14,03%

en la época de sequía comparada con la época de lluvia tanto en *B. repens* como en *B. pertusa*.

Uno de los principales nutrientes que hace parte de la MS, y que presentó una relación estrecha con la DEF, es la proteína cruda; en efecto, ésta explica en 88,2% ( $P<0,01$ ) el valor de DEF en *B. pertusa*. Por otro lado, se presentó una relación negativa entre los contenidos de FDA con la DEF, en donde los porcentajes de la DEF están definidos en 75,1% ( $P<0,01$ ) por el FDA; en *B. pertusa* estos valores ascendieron a 80,9% para el FDA y a 80,2% para el FDN.

#### Relación entre composición química y estructura anatómica

Es importante determinar las relaciones que existen entre la estructura anatómica (histológica), en función de indicadores de composición química y de calidad nutricional de las especies forrajeras, con períodos contrastantes de precipitación para poder entender las diferencias observadas en la calidad del forraje asociadas principalmente con la digestión ruminal.

*Tejidos rápidamente degradables*. Buena parte del área de estos tejidos corresponde al mesófilo, con paredes delgadas que incrementan la DIVMS; es así como los tejidos rápidamente degradables definen en 64,3% la DIVMS ( $P<0,001$ ). En *B. pertusa* se observó más claramente este efecto, y estos tejidos determinan en 77,22% la DIVMS ( $P<0,01$ ).

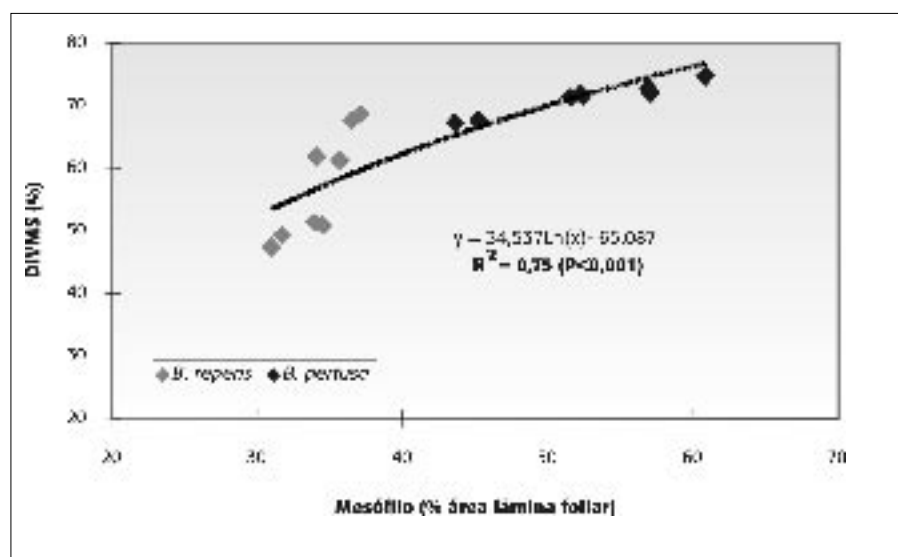
Estos resultados confirman que en especies gramíneas la mayor digestibili-

dad generalmente se asocia con mayores áreas y tasas de degradación del mesófilo y el floema, y con menores tiempos de retención ruminal y mayor consumo (Akin, 1989; Ventrella et al., 1977a).

El mesófilo incide directamente en la DIVMS y en la DEF; así, el porcentaje de la DIVMS está explicado en 74,7 % por el área del mesófilo ( $P<0,001$ ) (Figura 4) y este tejido, a su vez, expresa 59,8% de la DEF ( $P<0,001$ ). Estos resultados pueden estar asociados a la estructura de la pared celular del mesófilo, la cual consiste en lámina media, pared primaria y, en algunos casos, pared secundaria poco desarrollada (Paniagua et al., 1997; Pond et al., 1987). La relación más estrecha entre el mesófilo y la DIVMS la presentó *B. pertusa*, en la cual este tejido explica el 94% ( $P<0,001$ ) del porcentaje de DIVMS, efecto posiblemente relativo al contenido de PC, ya que el mesófilo explica en 83,7% el porcentaje de PC en *B. repens* y en 61,1% la PC en *B. pertusa*.

Los promedios de esta investigación son mayores a los reportados por Quiroz et al. (2000) con *P. purpureum* var. Mortt, *S. anceps* cv. Kazungula y *H. rufa*, quienes encontraron un coeficiente de correlación muy bajo entre DIVMS y el mesófilo ( $R^2=0,08$ ).

Adicionalmente, el floema en *B. repens* presentó una estrecha relación con la DIVMS, índice que está definido en 81,8% por el área del floema, efecto posiblemente relacionado con la morfología del floema, conformado por los elementos cribosos con pared celular primaria, compuesta fundamentalmen-



**Figura 4.** Relación entre digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y el área del mesófilo en *B. repens* y *B. pertusa*.



te por celulosa y pectina. Algunas enzimas, tales como peroxidasa, fosfatasa ácida y ATPasa, han sido localizadas en las paredes celulares de los elementos de los tubos cribosos de los elementos (Barceló *et al.*, 1987; Esau, 1985) lo cual posiblemente aumenta la digestibilidad.

Por otra parte, las estrechas relaciones entre la DIVMS y el floema, pueden estar ligadas con el porcentaje de PC que define en un 77,6% el área del floema, lo que se atribuye a que en los elementos cribosos se encuentra la proteína-P (Phloem-protein), sustancia viscosa que puede presentarse bajo forma amorfa, tubular, filamentosa o cristalina, dependiendo de la especie (Barceló *et al.*, 1987).

*Tejidos lentamente degradables.* En esta investigación la DIVMS y la DEF presentaron una relación estrecha con las áreas de las epidermis, especialmente en *B. repens* en la cual el área de la epidermis abaxial explica en 76,6% ( $P < 0,01$ ) el porcentaje de DIVMS; estos resultados son similares a los reportados en otras gramíneas por Akin y Burdick (1975) y Akin y Robinson (1982). Esta relación corrobora la encontrada en la DEF, la cual se explica en un 73,2% ( $P < 0,01$ ) por los tejidos lentamente degradados en *B. repens*, relación importante debido a que las epidermis requieren de íntima adhesión de las bacterias celulolíticas y la resistencia de estos tejidos a su degradación se debe tanto a su estructura anatómica como a su composición química (Akin y Rigsby, 1985).

Lo anterior puede ser explicado por la relación entre el área de epidermis abaxial y los porcentajes de PC en donde la epidermis abaxial explica en 88,5% ( $P < 0,01$ ) los contenidos de PC en *B. repens*.

La epidermis adaxial en *B. repens* presentó mayor resistencia a la digestión microbiana por tener en sus pared externa una capa de cutina y ser más lignificada. La capa de cutina es prácticamente impermeable a la adhesión microbiana (Akin y Benner, 1988), excepto para algunos hongos (Joblin y Naylor, 1989); esto también fue demostrado por Pond *et al.* (1987), quienes en *C. dactylon* verificaron la presencia de cutículas en la epidermis indigeribles al ataque microbiano.

La composición de la pared celular interna de las epidermis equivale al mesófilo (Chesson *et al.*, 1986; Twidwell *et al.*, 1991), que es rápidamente digerido (Hanna *et al.*, 1973; Wilson *et al.*, 1991); lo anterior puede explicar la relación positiva entre la epidermis adaxial y la PC y la DIVMS, así como la relación negativa

con la lignina y la FDN que se presentó en *B. repens*, especie en la cual el área de la epidermis adaxial explica el 61,4% de PC ( $P < 0,05$ ), en 57,5% la DIVMS ( $P < 0,05$ ), en 80,8% la lignina ( $P < 0,05$ ) y en un 57,2% el FDN ( $P < 0,05$ ). De igual manera, en los cortes se observó que la epidermis adaxial está fuertemente ligada a la estructura kranz por medio del esclerénquima lo que dificulta su degradación.

*Tejidos no degradables.* En esta investigación los tejidos no degradables en *B. pertusa* fueron definidos en un 73,6% y en 63,6% por el valor del FDN y FDA ( $P < 0,01$ ), efecto posiblemente asociado con el incremento del 198% del esclerénquima, tejido estructural que le da a la planta rigidez y soporte por ser altamente lignificado (Akin, 1989; Twidwell *et al.*, 1989).

En el mismo sentido, la estructura de la pared celular de *B. pertusa* fue muy compleja y variable, tanto química como histológicamente; estas observaciones han sido reportadas en otras gramíneas por Weimer (1996), quien afirma que todas estas diferencias químicas e histológicas condicionan posiblemente el modo de acción microbiana a los polisacáridos estructurales y, en último término, el ritmo y extensión de la degradación.

Adicionalmente, se observó que los tejidos no degradables de las gramíneas están muy asociados con los porcentajes de lignina; así, en *B. pertusa* la lignina explica en 73,5% ( $P < 0,005$ ) el área de esclerénquima y ésta, a su vez, define el 65,4% ( $P < 0,01$ ) el porcentaje de FDA; en *B. repens* el porcentaje de FDA se

explica en un 76,3% ( $P < 0,01$ ) por el área del esclerénquima. La lignina en las dos gramíneas está explicada en 62% por el área del xilema ( $P < 0,001$ ).

Si se considera que los tejidos no degradables están formados por células de paredes celulares gruesas, lignificadas e inertes al ataque microbiano, la relación encontrada fue positiva, conforme a lo observado por Wilson *et al.* (1983 y 1989), y Wilson y Hattersley (1989) (Figura 5). Estos valores son similares a los reportados por Queiroz *et al.* (2000) con *P. purpureum*, *S. anceps* y *H. rufa* los cuales encontraron un  $R^2 = 0,52$  ( $P > 0,05$ ).

En esta investigación las relaciones entre xilema y DIVMS fueron tan sólo de 39% ( $P < 0,01$ ), aunque superiores a los reportados por Queiroz *et al.* (2000) con *P. purpureum*, *S. anceps* y *H. rufa*, los cuales encontraron un  $R^2 = -0,08$  ( $P > 0,05$ ). En ambas gramíneas los porcentajes de DIVMS y DEG se vieron influidos negativamente por el área de los tejidos no degradables y éstos explican en 61,1% y en 47,2% los porcentajes de DIVMS y DEF, respectivamente.

Es importante resaltar que en *B. pertusa* el tamaño de los haces vasculares y de la estructura kranz son menores que en *B. repens*, lo cual incidió en que se encontrara una estrecha relación entre la DEF y la estructura kranz que explica en un 63,7% la DEF, efecto asociado con la lignificación, factor que más afecta a la degradación de los forrajes, tanto por su indigestibilidad *per se* como su efecto tóxico para la población microbiana ruminal (Jung *et al.*, 1983; Pond *et al.*, 1987). La solubilización a partir de las

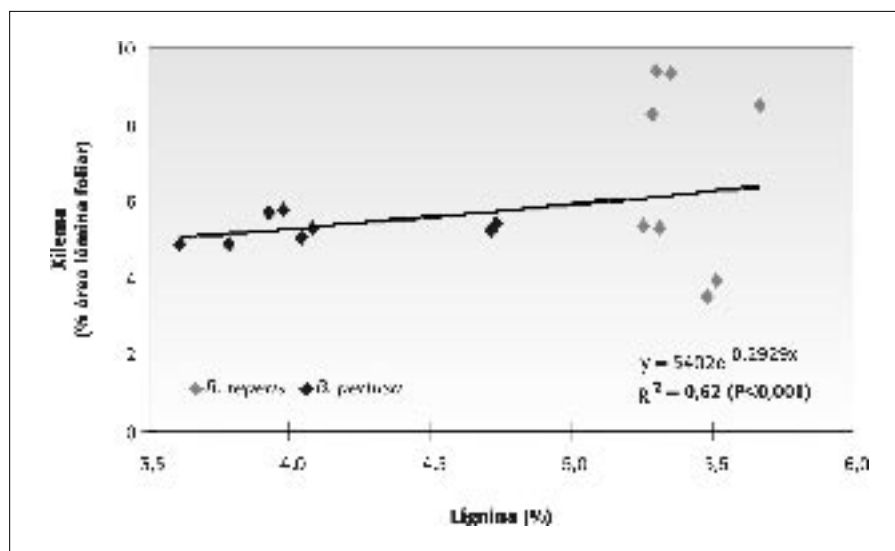


Figura 5. Relación entre el xilema y la lignina en *B. repens* y *B. pertusa*.

paredes celulares pudiera provocar en las zonas de activa degradación una concentración de fenoles próxima a los niveles tóxicos, por lo que pueden inhibir o al menos disminuir la actividad fibrolítica bacteriana (Fondevila *et al.*, 1998).

Adicionalmente, los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por otros autores, quienes afirman que la digestibilidad de las especies forrajeras está relacionada con su composición bromatológica (Minson, 1990; Van Soest *et al.*, 1991; Lascano y Carulla, 1992) y su composición histológica (Hanna *et al.*, 1973). Según Akin *et al.* (1973, 1984), se puede relacionar el potencial de digestibilidad con los porcentajes de sus diferentes tejidos o con tejidos específicos. Es así, como mayores cantidades de tejidos vasculares lignificados y esclerenquimáticos proporcionan menores tasas de digestibilidad (Wilkins, 1972; Wilson, 1976; Rodella *et al.*, 1982 y 1984).

Dentro de los tejidos no degradables uno de los tejidos que más tienen influencia sobre la degradación de la materia seca es el esclerenquima y éste explica en 64,3% el porcentaje de la DIVMS y en 69,5% el la DEG ( $P < 0,001$ ) en las dos gramíneas evaluadas (Figura 6). No obstante, el esclerenquima de las hojas aunque lignificado, no es totalmente inaccesible a la colonización microbiana, pudiéndose observar cierta degradación en sus zonas periféricas (Akin, 1989). Las hifas de los hongos tienen capacidad para perforar los tejidos vegetales más lignificados y así favorecen el acceso bacteriano a los tejidos internos (Akin *et al.*, 1989). En *B. pertusa* el área de esclerenquima explica en 70,6% ( $P < 0,01$ ) la DIVMS.

Esto posiblemente confirma que la presencia de tejidos altamente lignificados disminuye marcadamente la degradación (Akin *et al.*, 1984). Es importante anotar que, aunque el esclerenquima se encuentre en pequeños porcentajes dentro de las láminas foliares de *B. repens* y *B. pertusa*, dificulta la degradación de los microorganismos del rumen ligado a la presencia de lo que se ha denominado barreras químicas, conformadas por compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Akin, 1993 y Wilson, 1993). Estos resultados coinciden con los reportados por Queiroz *et al.* (2000) con *P. purpureum* var Mott, *S. anceps* var Kazungula y *H. rufa* los cuales encontraron un  $R^2 = 0,66$  ( $P < 0,01$ ) entre la DIVMS y el área de esclerenquima, la cual fue la única correlación significativa que reportaron.

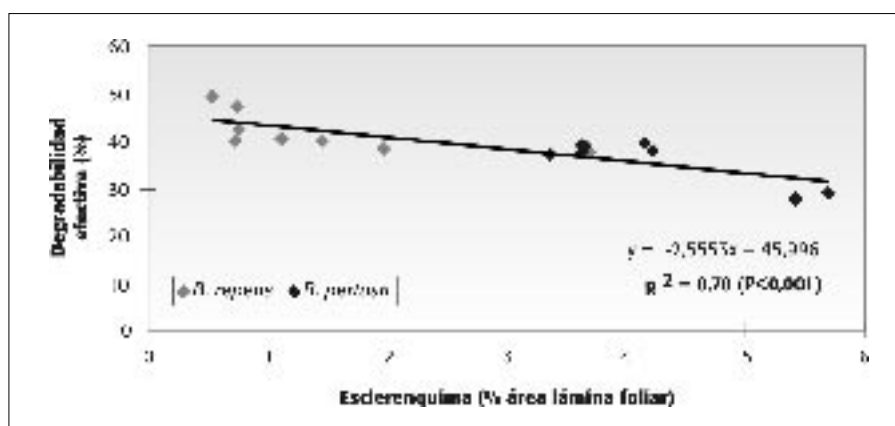


Figura 6. Relación entre la DEF y el área del esclerenquima en *B. repens* y *B. pertusa*.

Adicionalmente, en esta investigación la notable relación entre el esclerenquima y la DIVMS en la especie *B. repens*, podría explicarse por los contenidos de FDA y su relación estrecha con el esclerenquima; es así como el 76,3 % ( $P < 0,01$ ) del porcentaje de FDA es explicado por este tejido, superando los valores reportados por Queiroz *et al.* (2000) con *P. purpureum*, *S. anceps* y *H. rufa* quienes encontraron un  $R^2 = 0,67$  ( $P < 0,01$ ) valores similares a los encontrados en esta investigación con *B. pertusa* ( $R^2 = 0,65$ ) ( $P < 0,01$ ).

El esclerenquima está conformado por esclereidas en las que se deposita la pared secundaria y en la que posteriormente se produce la deposición de lignina que, junto a la pared primaria celulósica, desarrollan una pared secundaria engrosada y endurecida por la lignificación. La lignina modifica la pared celular proporcionando una mayor rigi-

dez y resistencia, regulando la hidratación de la celulosa, favoreciendo la elasticidad de la pared; además, establece una barrera impermeable a la célula formando una cubierta protectora de la pared frente a los ataques de agentes físicos, químicos y biológicos (Esau, 1985; Fahn, 1985; Paniagua *et al.*, 1997). Aunque el esclerenquima presentó relaciones estrechas con indicadores de calidad de forrajes, se debe resaltar que en esta investigación la asociación entre este tejido y la lignina fue la más alta  $R^2 = 0,89$  ( $P < 0,01$ ) en las dos gramíneas (Figura 7), lo cual representa valores superiores a los reportados por Queiroz *et al.* (2000) ( $R^2 = 0,14$ ;  $P < 0,01$ ).

Otro de los tejidos que hace parte de los tejidos no degradables es la estructura kranz, la cual en el *B. repens* ocupa en promedio el 19,6% del área total de la lámina foliar; el kranz está explicado en un 77,5% por el porcentaje de FDA

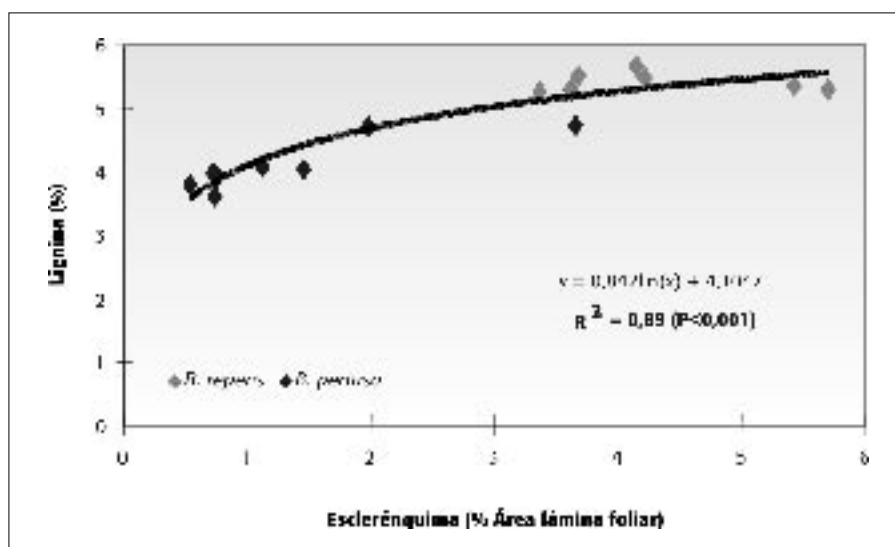


Figura 7. Relación entre la lignina y el área del esclerenquima en *B. repens* y *B. pertusa*.

( $P < 0,01$ ) y en un 69,1% por el porcentaje de FDN ( $P < 0,01$ ) valores superiores a los reportados por otros investigadores; estos resultados se pueden explicar debido a que las células kranz de estas gramíneas se caracterizaron por tener paredes celulares más gruesas que las correspondientes a las células del mesófilo. La baja degradación posiblemente estuvo asociada a la presencia de suberina resistente a la digestión con  $H_2SO_4$  (Martínez, 1985 y Esau, 1985). Las células especializadas de la estructura kranz le permite mayor eficiencia metabólica a las gramíneas  $C_4$  pero limita su calidad nutritiva (Wilson y Kennedy, 1996)

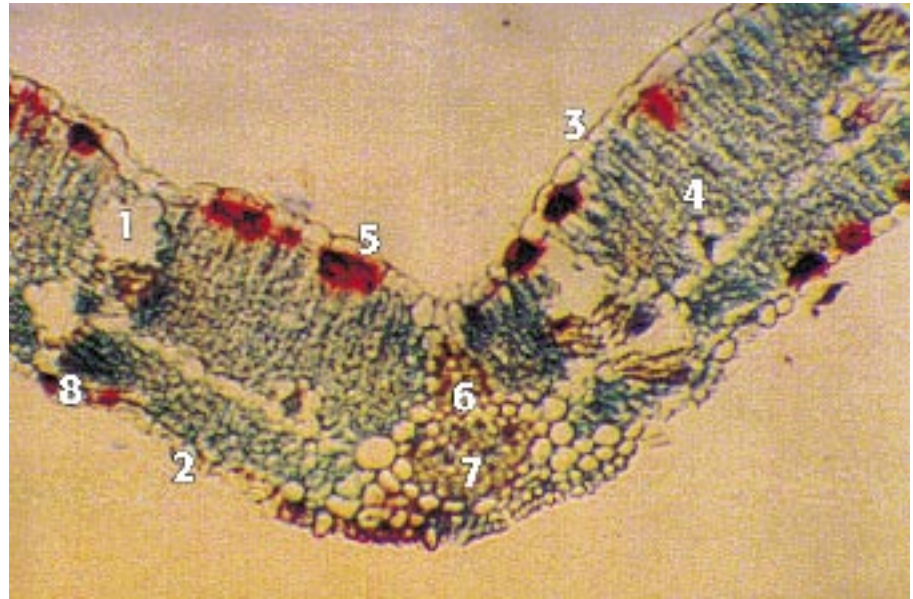
**Análisis de la estructura histológica de las leguminosas**

Como se observa en la Tabla 3, existe entre las leguminosas evaluadas diferencias en cuanto área y estructura del tejido de los folíolos; estas diferencias están relacionadas fundamentalmente con las especies y el efecto de la precipitación (Figura 8).

*Tejidos rápidamente degradables.* La dinámica de los tejidos rápidamente degradables conformados por floema, mesófilo e hidrénquima, está media-

da por la especie y las interacciones especie x época ( $P < 0,001$ ) y especie x período dentro de época ( $P < 0,001$ ). En las leguminosas, la deposición del área del floema fue 34,87% mayor al inicio

de lluvias. El valor del floema en *S. scabra* (0,62%) es similar al encontrado por Wilson (1993), quien reporta un valor  $< 1\%$  para esta especie e inferior al valor de *M. sativa* (1%).



**Figura 8.** Corte transversal de un foliolo de *T. cinerea* en época de sequía. 1. Hidrénquima; 2. Epidermis abaxial; 3. Epidermis adaxial; 4. Mesófilo; 5. Taninos; 6. Xilema; 7. Floema; 8. Esclerénquima.

**Tabla 3.** Promedios de áreas de tejidos provenientes de tres especies de leguminosas en dos épocas y cuatro períodos.

Tratamientos	D. barbatum				S. scabra				T. cinerea				Fuentes de variación				
	Lluvia		Sequía		Lluvia		Sequía		Lluvia		Sequía		Especie	Época	Periodo (Época)	Especie * Época	Especie * Periodo (Época)
Periodos	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final					
Tejidos	%																
Esclerénquima	1.54	1.32	10.09	8.19	5.38	2.47	5.36	4.9	3.13	3.55	3.81	7.17	ns	*	ns	*	*
Xilema	1.44	1.44	2.03	1.85	0.9	0.61	0.74	1.02	1.41	0.94	0.88	1.4	ns	ns	ns	ns	ns
Floema	1.19	0.79	0.63	0.4	0.95	0.5	0.45	0.58	1.1	0.82	0.63	0.92	ns	*	*	ns	ns
Epidermis adaxial	6.24	6.87	5.7	6.85	5.68	6.4	7.3	5.86	7.12	7.46	8.57	8.36	*	*	ns	*	*
Epidermis abaxial	7.76	7.83	7.09	6.21	9.96	6.87	7.05	6.83	6.28	6.97	7.85	8.76	ns	ns	ns	**	*
Hidrénquima	4.34	3.06	1.45	2.15	6.95	1.44	1.18	1.57	8.62	5.42	3.64	6.41	***	***	***	ns	*
Taninos	6.18	6.64	6.44	7.45	12.24	9.39	0.75	2.03	0	0	0.29	1.76	***	***	**	***	*
Mesófilo	71.29	72.03	66.57	66.88	57.92	72.32	77.16	77.19	72.32	74.83	74.31	65.21	***	**	**	***	***
Tejidos agrupados	%																
TRD	76.82	75.89	68.65	69.44	65.83	74.26	78.79	79.35	82.05	81.08	78.58	72.55	**	*	*	***	**
TLD	14.01	14.7	12.79	13.06	15.64	13.27	14.36	12.69	13.4	14.43	16.42	17.12	*	ns	ns	**	*
TND	9.16	9.4	18.56	17.49	18.52	12.47	6.85	7.96	4.54	4.49	4.98	10.33	***	**	*	***	**
Área	$\mu^2$																
Área campo	728.5	762.8	780.2	786.1	663.4	934.44	685.38	661.3	1260.4	713.4	725	638.6	ns	ns	ns	ns	ns
Área total corte	9834.7	6068.2	3903.7	4641.2	663.43	1325.8	1006.03	968.6	2600.5	1784.7	1728.8	1601.6	*	*	ns	*x	ns

\*= Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ); \*\*= Diferencias significativas ( $P < 0,01$ ); \*\*\*= Diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ); ns= Diferencias no significativas ( $P > 0,05$ ). TRD: Tejidos rápidamente degradables; TLD: Tejidos lentamente degradables TND: Tejidos no degradables.

Para el área total del mesófilo en las hojas de leguminosas se observó que *D. barbatum* y *T. cinerea* presentaron mayores áreas en lluvia que en sequía con incrementos del 6,8% y 5,18% respectivamente, patrón contrario a *S. scabra*, especie que incrementó el área del mesófilo en un 18,51% en la época de sequía, particularidad importante para la zona de estudio, en donde esta característica de xerofítica de *S. scabra* permite mejorar la disponibilidad de nutrientes en la época de sequía. El promedio encontrado en *S. scabra* en esta investigación (71,14%) es inferior a los reportes de Wilson (1993) quien encontró un valor de 88% para esta especie y similar al promedio de *M. sativa* (77%).

Al comparar los promedios sobre el área del hidrénquima, se encontró que las mayores áreas se obtuvieron en *T. cinerea* con un valor promedio de 6,02%, superior a *D. barbatum* 2,75% y *S. scabra* 2,78%. Las mayores áreas de hidrénquima de las especies se presentaron en lluvias ( $P < 0,01$ ) con valores promedio de 4,97%, es de notar que las tres leguminosas presentaron un descenso del área del hidrénquima en la época seca con valores entre 1,9% a 2,8% y fue más marcado en la especie *S. scabra*.

La especie *T. cinerea* presentó la mayor área cubierta por tejidos rápidamente degradables superando a las demás especies con un valor de 78,56%. Durante la época de lluvias se incrementaron las áreas de tejidos rápidamente degradables en las especies *D. barbatum* y *T. cinerea* y dentro de la época el periodo de inicio de lluvias presentó la mayor área con valores de 76,82% y 82,02% para *D. barbatum* y *T. cinerea* respectivamente. La especie *S. scabra* incrementó en un 11,41% el área de estos tejidos en la época de sequía, característica muy deseable en especies forrajeras de zonas secas.

Tejidos lentamente degradables: En las leguminosas la especie ( $P > 0,270$ ), la época ( $P > 0,845$ ) y las interacciones de especie por época ( $P > 0,139$ ) no influyeron sobre la proporción de los tejidos lentamente degradables, conformados por las epidermis adaxial y epidermis abaxial.

Las mayores áreas la epidermis adaxial, se encontraron en *T. cinerea* superando a *D. barbatum* y *S. scabra* con un valor promedio de 7,87%. Adicionalmente, se observó que *D. barbatum* y *S. scabra* fueron superiores en la época de lluvia y decayeron en la época de sequía, patrón inverso al reportado por

*T. cinerea*. Sin embargo, se presentan diferencias significativas en la interacción especie por periodo dentro de época ( $P < 0,05$ ), en donde *T. cinerea* presentó los mayores valores al final de lluvias y al inicio de sequía con 7,46% y 8,57%.

El área de epidermis abaxial en *D. barbatum* y *S. scabra* fue mayor en la época de lluvia decayendo en la época de sequía, patrón inverso lo presentó la especie *T. cinerea* se incrementó el área en un 25,35% en la época de sequía. El mayor valor al inicio de lluvia lo presentó *S. scabra*, con un valor promedio de 9,96%. El incremento del área de la epidermis está asociado a cambios estructurales de las plantas xeromórficas, que le permite a la planta tolerar más la sequía (Fahn, 1985).

*S. scabra*, disminuyó el área de tejidos lentamente degradables al final de lluvias y sequía en un 15,15% y 11,63% respectivamente. Wilson (1993), reporta para *S. scabra* un valor de 9% para epidermis promedio inferior al encontrado en esta investigación (13,9%).

Tejidos no degradables: En las leguminosas la especie ( $P < 0,001$ ), la época ( $P < 0,05$ ), las interacciones de especie x época ( $P < 0,001$ ) y especie x período (época) ( $P < 0,001$ ), influyeron en forma significativa sobre la proporción de los tejidos no degradables conformados por los tejidos esclerénquima, xilema y taninos.

Para el área de esclerénquima todas las leguminosas presentaron mayor valor ( $P < 0,01$ ) en la época de sequía con valores de 9,14%, 5,14% y 5,49% para *D. barbatum*, *S. scabra* y *T. cinerea*. El valor encontrado en *S. scabra* (4,52%) supera al reportado por Wilson (1993), quien obtuvo un valor de 0% para *S. scabra*. En esta investigación se observó que las especies que menos cambiaron sus áreas de esclerénquima por efecto de la precipitación fueron *S. scabra*, que mantuvo valores promedios de 3,93% y 5,14% durante lluvia y sequía, y *T. cinerea* con valores similares en el final de lluvias e inicio de sequía ( $P > 0,05$ ), efecto posiblemente asociado con su gran desarrollo radicular.

Las mayores áreas en taninos se obtuvieron con *D. barbatum* (6,67%) y *S. scabra* (6,10%) superando a *T. cinerea* (0,51%). En la época de lluvia se presentaron las mayores áreas de taninos en las hojas (5,47%). Es de señalar que en la especie *T. cinerea* no se observaron taninos en lluvia, aunque presentó valores de 0,29 y 1,76% al inicio y final de la época de sequía. Los taninos en las leguminosas disminuyeron al final de las lluvias en

12,97% y se incrementaron al final de sequía en 50,26%.

El área del xilema en *D. barbatum* fue superior con un valor de 1,69% a *T. cinerea* y *S. scabra* (1,16% y 0,81%) respectivamente. El área del xilema de *S. scabra* es similar al reportado por Wilson (1993), quien logró valores de 1% para *S. scabra* e inferior al promedio de *M. sativa* (2%). En este tejido no se presentaron interacciones entre épocas, especies x época, período dentro de época y especie x período dentro de época, lo que indica que las especies exhiben un comportamiento en la deposición del xilema igual según la época y el período dentro de época.

Al analizar los promedios del área en tejidos no degradables se encontró que *D. barbatum* superó a *S. scabra* y *T. cinerea* y, como era de esperarse, en la época de sequía se presentaron los mayores promedios con valores de 11,07% incrementándose en un 17,73%. Las áreas de estos tejidos en las especies *S. scabra* y *T. cinerea* aumentaron al final de la sequía comparadas con el inicio de la sequía en 16,20 y 107,42%, respectivamente.

Área total de la hoja. El análisis de varianza para el área total de la hoja en leguminosas indicó diferencias significativas por efecto de la especie ( $P < 0,001$ ); la época no influyó en el área total de la hoja ( $P > 0,069$ ). En esta variable no se presentaron interacciones entre las leguminosas evaluadas con la época ( $P > 0,11$ ) ni con los períodos ( $P > 0,26$ ).

Al comparar los promedios del área total en las diferentes especies se encontró que el mayor valor lo presentó *D. barbatum* ( $6.112 \mu^2$ ) superando a *T. cinerea* y *S. scabra*, las cuales presentaron áreas de  $1.928,9 \mu^2$  y  $991 \mu^2$ . Aunque todas las especies mostraron similares áreas promedio ( $P > 0,05$ ) en las dos épocas, las mayores áreas se manifestaron en la época de lluvia y descendieron marcadamente en un 60,84% en la época de sequía.

Una de las características más importantes de las hojas xeromórficas es la disminución en su áreas en la sequía (Fahn, 1985; Becerra et al., 2000).

#### Análisis químicos de las láminas foliares de leguminosas

En la Tabla 4 se muestran los promedios obtenidos al analizar la composición química de las láminas de las leguminosas evaluadas en los cuatro períodos de precipitación.

Proteína cruda (PC). Los promedios indican que la mayor concentración de

**Tabla 4.** Composición nutricional de folíolos de *D. barbatum*, *S. scabra* y *T. cinerea* en cuatro períodos contrastantes de precipitación.

Tratamiento	D. barbatum				S. scabra				T. cinerea				Fuentes de variación				
	Lluvia		Sequía		Lluvia		Sequía		Lluvia		Sequía		Especie	Época	Especie * Época	Período (Época)	Especie * Período (Época)
Época	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final					
PC	13.4	12.3	12.2	12.1	16	16.6	18.7	15.8	24.0	20.1	19.2	18.6	***	***	***	***	***
FDN	34.9	37.8	35.2	44.5	28.4	31.3	27.3	33.4	28.0	31	31.6	33.9	***	***	***	***	***
FDA	24.5	29.8	26.9	33.0	19.9	19.1	20.6	29.4	18.8	17.8	20.4	21.9	***	***	***	***	***
LIGNINA	7.6	10.6	8.0	10.4	6.6	5.83	6.6	6.7	5.4	5.5	6.4	7.1	***	***	***	***	***
DIVMS	86.2	71.8	75.4	66.1	80.9	69.2	75.8	65.7	82.3	80.7	81	74.7	***	***	***	***	***
DEF	54.6	44.9	44.3	38.8	55.5	40.7	47.0	34.6	61.4	50.4	53.6	43.9	***	***	***	*	ns

\* Diferencias significativas (P<0,05); \*\*=Diferencias significativas (P<0,01); \*\*\*= Diferencias altamente significativas (P<0,001); ns = Diferencias no significativas (P>0,05). DEF: Degradabilidad Efectiva.

PC fue para *T. cinerea* con 20,52%, seguido de *S. scabra* con 16,80% y *D. barbatum* con 12,52% (P<0,001). En cuanto a la época se observa que las leguminosas presentaron mayores niveles de PC en la época de lluvia que en sequía con valores de 17,08% y 16,14% (P<0,001). En los períodos dentro de época los mayores porcentajes de PC se presentaron al inicio de lluvia y sequía, con valores de 17,80% y 16,73% (P<0,001). Estos valores son superiores a los reportados por Chamorro *et al.* (1996) con promedios de 15,31%, 11,75% y 15,38% para *S. scabra*, *T. cinerea* y *D. barbatum*, respectivamente.

La interacción especie por época establece que *T. cinerea* presentó los promedios más altos de PC en la época de lluvia y sequía con 22,08% y 18,95% (P<0,001). Es importante resaltar, que *S. scabra* presentó una mayor concentración de PC en la época de sequía comparada con la de lluvia (16,31% y 17,29%), característica que le da un valor agregado principalmente para regiones secas tropicales. La interacción especie x período dentro de época, señala que todas las especies presentaron mayores porcentajes de PC al inicio que al final de sequía y *T. cinerea* presentó el mayor promedio (19,23%). El inicio de lluvias es el período donde se presentaron los mayores valores que al final de lluvia en *T. cinerea* y *D. barbatum* con valores de 24,01% y 13,41% (P<0,001).

**Fibra en detergente neutro (FDN).** Los promedios indican que el mayor porcentaje de FDN fue para *D. barbatum* con 38,14%, (P<0,001). Las leguminosas presentaron menores porcentajes de FDN durante la época de lluvia que en la

época de sequía, con valores de 31,93% y 34,35% (P<0,001); así mismo, ocurrieron menores porcentajes al inicio de lluvia y sequía (30,47% y 31,40%) (P<0,001), valores inferiores a los reportados por Chamorro *et al.* (1996) con promedios de 60,33%, 68,31% y 64,54% para *S. scabra*, *T. cinerea* y *D. barbatum*, respectivamente.

La interacción especie x época indica que el menor porcentaje de FDN lo presentó *T. cinerea* con 29,51% seguido de *S. scabra* con 29,9% y *D. barbatum* con 36,39% en lluvias (P<0,001). Todas las especies exhibieron menores porcentajes de FDN al inicio de lluvias y sequía, mientras que *S. scabra* presentó el menor valor (27,35%) al inicio de sequía, seguida de *T. cinerea* con 28,03% al inicio de lluvia (P<0,001).

**Fibra en detergente ácido (FDA).** Los promedios indican que el menor porcentaje de FDA se presentó en *T. cinerea* con 19,76% (P<0,001). Valores inferiores a los reportados por Chamorro *et al.* (1996) con promedios de 42,11%, 46,66% y 42,43% para *S. scabra*, *T. cinerea* y *D. barbatum*, respectivamente.

Se observó que las leguminosas presentaron menores porcentajes de FDA durante la época de lluvia que en la época de sequía con valores de 21,68% y 25,43% (P<0,001) y los menores porcentajes de FDA se presentaron al inicio y final de lluvia con 21,07% y 22,30% (P<0,001). El menor porcentaje de FDA lo presentó *T. cinerea* en la época de lluvia con 18,34%, seguido de *S. scabra* con 19,53% y *D. barbatum* con 27,19%, igual comportamiento se presentó en la época de sequía (P<0,001). Durante todos los períodos *T. cinerea* mostró los menores porcentajes de

FDA con 18,8%, 17,8%, 20,39% y 21,98% para inicio y final de lluvia y sequía, respectivamente (P<0,001).

**Lignina.** El menor porcentaje de lignina se presentó en *T. cinerea* con 6,12% seguido por *S. scabra* con 6,48% y el mayor valor lo presentó *D. barbatum* con 9,17% (P<0,001). Las leguminosas evidenciaron menores porcentajes de lignina durante la época de lluvia que en la época de sequía con valores de 6,94 y 7,57% (P<0,001) y los menores porcentajes se presentaron al inicio de lluvia y de sequía con 6,58% y 7,04% (P<0,001).

Los menores porcentajes de lignina los presentó *T. cinerea* con 5,47% (P<0,001). En la época de sequía los menores valores los presentaron *T. cinerea* y *S. scabra* con promedios de 6,7% (P<0,001). En el inicio y final de lluvia e inicio de sequía *T. cinerea* presentó los menores porcentajes de lignina con 5,45%, 5,5% y 6,43% respectivamente (P<0,001).

**Digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS).** La mayor DIVMS fue para *T. cinerea* con 79,71%, seguida de *D. barbatum* con 74,91% y *S. scabra* con 72,95% (P<0,001). Valores superiores a los reportados por Chamorro *et al.* (1996) con promedios de 62,21, 48,79 y 42,65% para *S. scabra*, *T. cinerea* y *D. barbatum*, respectivamente. El promedio en *S. scabra* fue mayor al valor reportado por Wilson (1993), quien encontró un valor en *S. scabra* de 63,9% y similar al reporte de *M. sativa* (74,1%).

Las leguminosas presentaron mayor de DIVMS en la época de lluvia que en la época de sequía con valores de 78,55 y 73,16% (P<0,001). Los mayores porcentajes de DIVMS se presentaron



al inicio de lluvia y sequía con valores de 83,18% y 77,43% ( $P < 0,001$ ). *T. cinerea* presentó los promedios más altos de la DIVMS en la época de lluvia y sequía con 81,54% y 77,88% ( $P < 0,001$ ). Se observó que *S. scabra* y *D. barbatum* presentaron mayores valores de la DIVMS en la época de lluvia comparada con la época de sequía con promedios de 79,03%, 70,79% y 75,08%, 70,80%, respectivamente. Todas las especies presentaron mayores porcentajes de DIVMS al inicio de las lluvias si bien *D. barbatum* presentó el mayor promedio (86,21%). El final de sequía es el período en el que se presentaron los menores valores en todas las leguminosas ( $P < 0,001$ ).

**Degradabilidad efectiva de la materia seca (DEF).** En la interacción entre especie x período dentro de época no se presentaron diferencias ( $P > 0,24$ ). La mayor DEF la presentó *T. cinerea* con 52,36%, seguido de *D. barbatum* con 45,71% y *S. scabra* con 44,46% ( $P < 0,001$ ).

Las leguminosas presentaron mayores niveles de la DEF durante la época de lluvia que en la época de sequía, con valores de 51,27% y 43,74% ( $P < 0,001$ ). Los mayores porcentajes de la DEF se presentaron al inicio de lluvia y sequía con valores de 57,20% y 48,33% ( $P < 0,001$ ). *T. cinerea* presentó los promedios más altos de DEF en la época de lluvia y sequía con 55,94% y 48,78% ( $P < 0,001$ ). Adicionalmente, tanto en *S. scabra* y *D. barbatum* los valores de DEF en la época de lluvia fueron mayores que en sequía con promedios de 49,79% y 41,64% y 48,10% y 40,82%, respectivamente.

Todas las especies presentaron mayores porcentajes DEF al inicio de lluvia y *T. cinerea* presentó el mayor promedio 61,44%, seguido de *S. scabra* con 55,5% ( $P < 0,01$ ). Se destaca que en todos los períodos evaluados los mayores valores de DEF los obtuvo *T. cinerea*; el final de sequía es el período donde se presentaron los menores valores en todas las especies ( $P < 0,001$ ).

#### Relación entre la composición química y la estructura anatómica

**Tejidos rápidamente degradables.** En esta investigación los tejidos rápidamente degradables presentaron una relación negativa con el FDA y la lignina, definiéndolos en 74,7% y 95,3% ( $P < 0,01$ ) y dentro estos los tejidos el mesófilo ocupa un papel definitivo; así, *D. barbatum*, presenta una relación inversa con el FDA y la lignina, explicándolos en un 68% y 91,3% ( $P < 0,01$ ) respectivamente. Se observó

que el mesófilo en todas las leguminosas experimentales se degradó rápidamente y en la mayoría de las especies no se hallaron áreas residuales después de 24 horas de incubación ruminal.

Es importante destacar que en *D. barbatum* el esclerénquima presentó una relación estrecha y negativa con los tejidos rápidamente degradables, expresándolos en un 90,9%. En esta especie, la DIVMS está relacionada con los tejidos rápidamente degradables y éstos la explican en un 65,6%. Lo anterior posiblemente esté asociado con los porcentajes de proteína cruda que explican en 80,2% y 85,9% la DIVMS y la DEF.

El mesófilo en las leguminosas está conformado por el parénquima de empalizada (especializado en la fotosíntesis), el parénquima esponjoso (especializado en intercambio de gases que, a través de las cámaras subestomáticas y los estomas, alcanzan el exterior, con lo que aumenta la eficacia de la fotosíntesis), y las paredes celulares que en estos tejidos son delgadas. Adicionalmente, el mesófilo está provisto de espacios intercelulares, condiciones que permiten seguramente mayor área de acción de las bacterias logrando una rápida degradación de las células del mesófilo (Esau, 1977 y 1985; Akin y Robinson, 1982).

Se considera que las hojas de las leguminosas pueden ser degradadas fácilmente debido a la alta proporción de mesófilo y floema; sin embargo, las hojas de algunas especies o cultivares con concentraciones altas de taninos presentan baja degradación (Akin y Benner, 1988 y Akin, 1989).

Según Esau (1985) el floema es el tejido más importante para el transporte de

substancias alimenticias de las plantas vasculares. Sus células, aparte de las fibras y esclereidas, no forman membranas tan rígidas y persistentes como las del xilema. En las tres leguminosas evaluadas el floema explica el 59% de la DIVMS ( $P < 0,01$ ); las células de este tejido tienen paredes celulares delgadas que se asocian con la DIVMS (Figura 9). En *S. scabra* el hidrénquima explica los valores de la DIVMS en un 60,6% ( $P < 0,05$ ).

**Tejidos lentamente degradables.** En esta investigación los tejidos lentamente degradables están conformados por las epidermis abaxial y adaxial, las cuales estuvieron asociadas a los porcentajes de FDN y FDA. En la especie *D. barbatum* la epidermis abaxial está explicada en un 55,8% ( $P < 0,05$ ) por el porcentaje de FDN, y en un 51,5% ( $P < 0,05$ ) por el FDA.

Observaciones realizadas por Akin (1979) con microscopía electrónica sobre tejidos similares y en especies diferentes (o aún en cultivares dentro de especie), reporta que las epidermis presentan diferentes tasas de degradación lo que indica que las características inherentes a la pared celular, como por ejemplo, la composición química y los enlaces químicos, afectan directamente la digestibilidad del tejido.

**Tejidos no degradables.** En esta investigación los tejidos no degradables estuvieron altamente relacionados con el contenido de lignina, la cual explica en 81% los tejidos no degradables (Figura 10).

En *D. barbatum* existe una relación entre los tejidos no degradables con la FDA y la lignina, definiéndolos en 73,7% y 97,8% ( $P < 0,01$ ), respectivamente. Adicionalmente, los tejidos no degradables explican en un 62,3% la DIVMS en esta especie.

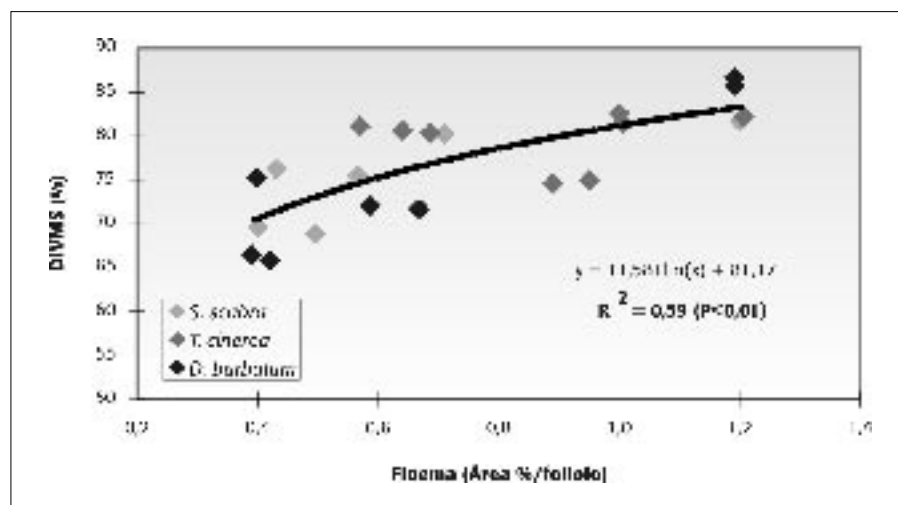


Figura 9. Relación entre la DIVMS y el área del floema en tres leguminosas forrajeras.

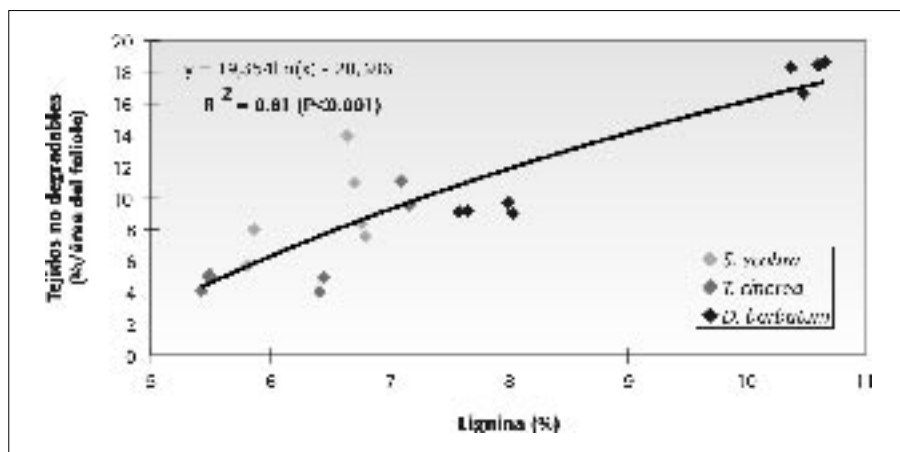


Figura 10. Relación entre los tejidos no degradables y la lignina en tres leguminosas.

En *D. barbatum*, como en la mayoría de las leguminosas, la DIVMS y la DEF están negativamente influidas por los porcentajes de FDA; ésta explica en 92% ( $P < 0,01$ ) y en 81,9% ( $P < 0,01$ ) el valor de DIVMS y de DEF, respectivamente. Estas relaciones, tienen importantes implicaciones en la utilización de esta especie en la alimentación de rumiantes (Wilson, 1993).

Uno de los metabolitos secundarios que más incide en la degradabilidad de las leguminosas son los taninos, los cuales, con la técnica de coloración de contraste utilizada (zafranina + fast green) se visualizan y se cuantifica el área que ocupan en las hojas.

Los taninos presentes en las leguminosas fluctúan con la especie y con la época; se hallaron los siguientes valores: *S. scabra* (12,24%, 9,39% y 0,75%, 2,03%); *D. barbatum* (6,18%, 6,64% y 6,44%, 7,45%), *T. cinerea* (0,0%; 0,0% y 0,29%, 1,76%) para los periodos de inicio y final de lluvia y sequía, respectivamente. En *D. barbatum* los taninos presentaron relación con los porcentajes de la DEF y esos explican el 58,2% de la DEF ( $P < 0,05$ ).

Lascano y Carulla, (1992) han relacionado los taninos con efectos negativos sobre la digestión de la proteína y la fibra. Sin embargo, la presencia de bajas concentraciones de taninos en la dieta (i.e. 2,2%) incrementa la absorción de aminoácidos en el intestino delgado, al reducir la degradación de la proteína a nivel del rumen (Waghorn *et al.*, 1987), por medio de la formación de complejos fuertes por grupos hidroxilos y en algunos casos carboxilos (Carulla y Pabón, 2004).

Al igual que en las gramíneas, el porcentaje de lignina en las hojas de *D. barbatum* presenta una muy estrecha relación con los porcentajes del esclerén-

quima y explica un 96,7% el promedio de lignina ( $P < 0,01$ ).

Los resultados presentados confirman la estrecha relación de la estructura anatómica y la composición química de los forrajes, por lo cual, los porcentajes de los tejidos proporcionan una buena estimación del valor nutritivo de las especies forrajeras.

### Conclusiones

Las hojas de *B. repens*, *B. pertusa*, *S. scabra*, *D. barbatum* y *T. cinerea* presentaron modificaciones en la estructura histológica como respuesta a la disponibilidad de agua, la cual influyó directamente sobre el desarrollo y proporción de los tejidos foliares, además de su relación con la composición química, confirmando el rol de la anatomía foliar y su influencia en calidad nutricional de los forrajes.

Se presentaron claras diferencias entre la composición química de las láminas foliares de las gramíneas y los foliolos de las leguminosas: las gramíneas presentaron mayores promedios de FDN (entre 58,6% y 67,2%), menores porcentajes de lignina (entre 3,7% y 5,4%), menores DIVMS (entre 48,3% y 74,4%) y menores DEF (entre 28,4% y 48,3%). Las leguminosas obtuvieron menores porcentajes de FDN (entre 27,3% y 44,5%), mayores porcentajes de lignina (5,4% y 10,6%) y mayores porcentajes de DIVMS y DEF con rangos entre 65,7-86,2% y 34,6-61,45%, respectivamente.

En leguminosas existe estrecha relación entre el floema y la DIVMS, la lignina con el esclerénquima y los tejidos no degradables con la lignina. En gramíneas se presentó una relación íntima entre las áreas del mesófilo, los tejidos rápidamente degradables con los por-

centajes de DIVMS y DEF; a su vez, éstos se asociaron negativamente con el esclerénquima, tanto en gramíneas como en leguminosas.

Las leguminosas presentan mayor área de tejido epidérmico, menor tejido vascular que las gramíneas y una gran abundancia de células del mesófilo, características que indujeron mejores indicadores de calidad nutricional; la complejidad de la vaina parenquimática en *B. repens*, conformada por mestoma y estructura kranz, es un limitante para la degradación microbiana de las láminas foliares; bajo las condiciones de esta investigación el mayor potencial nutricional fue para *B. pertusa* y *T. cinerea*, seguidas por *S. scabra*.

Los resultados de los análisis de la estructura anatómica de *B. pertusa*, *B. repens*, *T. cinerea* y *D. barbatum* en esta investigación son los primeros reportes a nivel mundial, lo que constituye un avance en el conocimiento de la biodiversidad forrajera nacional.

### BIBLIOGRAFÍA

- Akin, D.E. 1993. Perspectives of cell wall biodegradation session synopsis. Forage cell structure and digestibility of forages. *Agronomy Journal* 81: 17-23.
- Akin, D.E. 1989. Histological and physical factors digestibility of forages. *Agronomy Journal* 81: 17-23.
- Akin, D.E. 1979. Microscopic evaluation of forages digestion by rumen microorganisms review. *Journal of Animal Science* 48(3): 701-709.
- Akin, D.E. y Burdick, D. 1975. Percentage of tissue types in tropical an temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. *Crop Science* 15: 661-668.
- Akin, D.E. y Burdick, D. 1973. Microanatomical differences of warm-season grasses revealed by light and electron microscopy. *Agronomy Journal* 65: 533-537.
- Akin, E.D.; Robinson, E.L.; Franklin, E.B. y Himmelsbach, S.D. 1977. Changes with maturity in anatomy, histochemistry, chemistry and tissue digestibility of Bermudagrass plant parts. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 25(1):179-186.
- Akin, D.E. y Robinson, E. 1982. Structure of leaves and stems of arrowleaf acrimson clovers as related to *in vitro* digestibility. *Crop Science* 22: 24-29.
- Akin, D.E. y Barton, F.E. 1983. Rumen microbial attachment and degradation of plant cell wall. *Feed Proceeding*. 42: 114.
- Akin, D.E.; Wilson, J.R. y Windham, W.R. 1983. Site and rate of digestion of tissue

types in leaves of  $C_3$ ,  $C_4$ , and  $C_3/C_4$  intermediate *Panicum* grass species. *Crop Science* 23: 141-146.

Akin, D.E.; Brown, R.H. y Rigsby, L.L. 1984. Digestion of stem tissues in *Panicum* species. *Crop Science* 24: 769-773.

Akin, D.E. y L.L. Rigsby. 1985. Degradation of Bermuda and orchardgrass by species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 825-830.

Akin, D. E. y Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1117-1125.

Akin, D.E.; Lyon, C.E.; Windham, W.R. y Rigsby, L.L. 1989. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 611-616.

Allinson, D.W. y Osbourn, D.F. 1970. The cellulose-lignin complex in forages and its relationship to forage nutritive value. *Journal of Agricultural Science* 74: 23-26.

Alves de Brito, C.A.; Alquini, Y.; Rodella R. y Deschamps, C. 1997. Alterações histológicas de três ecotipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), após digestão *in vitro*. In: Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 34, Juiz de Fora-MG. Anais da XXXIV Reuniao da SBZ. 2: 12-14

Alves de Brito, C.A.; Rodella, R.; Deschamps, C. y Alquini, Y. 1999. Anatomia quantitativa e degradacao in vitro de tecidos em cultivares de Capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Revista Brasileira de Zootecnia* 28(2): 223-229.

AOAC. 1975. Official Methods of Analysis (12<sup>th</sup> edit). Association of Official Agricultural Chemists, Washington DC. 1094 p.

Barceló, J.C.; Nicolás G.R.; Sabater, B.G. y Sánchez, R.T. 1987. Fisiología vegetal. Cuarta edición. Editorial Pirámide, S.A. Madrid. pp. 161-170.

Becerra, L.N; Barrera, E.T y Marquinez, X.C. 2002. Anatomía y morfología de los órganos vegetativos de plantas vasculares. Unibiblos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 276 p.

Carulla, J. y Pabón, M. 2004. Un sistema *in vitro* para evaluar los efectos de los taninos en la degradación de la proteína bajo condiciones ruminales y abomasales. En: Hess y Gómez (eds.). Taller: Taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. CIAT-ETH. 63 p.

Chamorro, D.; García, J.; y Osorio, D. 1996. Recolección y determinación de leguminosas espontáneas con potencial forrajero adaptadas a zonas ganaderas de clima cálido seco en el departamento del Tolima. Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia. 130 p.

Chamorro, D.; Roncallo, B.; Cipagauta, M.; Sánchez, M.; Barros, J.; Arcos, J.; Acero, J.; Hernández J.; Bonilla, R.; Lanao, S.; Vuelvas, S.; Torres, E.; Sierra, M.; Carrero, G.; Romero, H. y Vanegas, M. 2002. Los sistemas silvopastoriles y su impacto en la ganadería del trópico bajo colombiano. Manual técnico. Plan de Modernización Tecnológica de la Ganadería Bovina Colombiana. 98 p.

Edwards, G.E. y Huber, S.C. 1981. The  $C_4$  pathway. In: The biochemistry of plants. Photosynthesis. 8: 237-281.

Esau, K. 1977. Anatomy of seed plants. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley y Sons, Inc. New York. 550 p.

Esau, K. 1985. Anatomía vegetal. 3<sup>a</sup> ed. Editorial Omega S.A. Barcelona (España). pp. 25, 26; 99; 168-186; 173-174; 202; 250-290; 296-297; 460-462.

Fahn, A. 1985. Anatomía vegetal. 3<sup>a</sup> ed. Ediciones Pirámide, S.A. Madrid. 569 p.

Flores, J.A.; Moore, J.E. y Sollenberger, L.E. 1993. Determinants of forage quality in Pensacola bahiagrass and mott elephantgrass. *Journal of Animal Science* 71: 1606-1614.

Fondevila, M.; Muñoz, G.; Castrillo, C.; Vicente, F. y Martín, S.M. 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. *Revista de la Facultad de Agronomía* 15: 87-106.

Hanna, W.W.; Monson, W.G. y Burton, G.W. 1973. Histological examination of fresh forage leaves after *in vitro* digestion. *Crop Science* 13(1): 98-102.

Hattersley, P.W. y Watson, L. 1976.  $C_4$  grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-Malic enzymes species and PCK or NAD-Malic enzyme species. *Australian Journal of Botany* 24: 279-308.

Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry. Principles and practice. Ed. W.A. Freeman y Co. S. Francisco. 408 p.

Joblín, K.N. y Naylor, G.E. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS. Microbiology Letters* 65: 111-122.

Jung, H. y Fahey, C. 1983. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin. *Review Journal of Animal Science* 57(1): 206-219.

Jung, H.G.; Fahey, G.C. y Merchen, N.R. 1983. Effects on ruminant digestion and metabolism of phenolic monomers of forages. *British Journal of Nutrition* 50: 637-651.

Laetsch, W. 1974. The  $C_4$  syndrome: structural analysis. *Annual Review Plant Physiology* 25: 25-72.

Lascano, C. y Carulla, J. 1992. Quality evaluation of tropical leguminous trees and shrubs with tannins for acid soils. In:

Proceedings of XXIX Animal Meetings of the Sociedade Brasileira de Zootecnia 10: 107-129.

Minson, D.J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic Press, Inc. San Diego CA. 450 p.

Ørskov, E.R.; McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92: 499.

Paciullo, D.S.; Gomide, J.; Monteiro, E.; Queiros D. y Gomile C. 2002. Características Anatómicas da lamina foliar e do colmo de gramíneas forrageiras tropicais, em funcao do nivel de insercao no perfilho, da idade e da estacao de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31(2): 890-899.

Paniagua R.; Nistal M.; Sesma P.; Álvarez, U.M.; Fraile B.; Anadón R.; Sáez F.J. y De Miguel M.P. 1997. Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. pp. 775; 765-766; 775-783; 788-796; 811-805; 869; 875-876.

Pond, K.R.; Ellis, W.E.; Lascano C.E. y Akin, D.E. 1987. Fragmentation and flow of grazed coastal bermudagrass through the digestive tract of cattle. *Journal of Animal Science* 65: 609-618.

Queiroz, D.S.; Gomide, J.A. y Maria, J. 2000. Evaluation of top and bottom leaf and stem fractions from tiller of three forages grasses: 1. *in vitro* disappearance and chemical composition. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29(1): 53-60.

Rodella, R.A.; Ishiy, C.M. y Maimoni R. 1982. Estudio quantitativo de características anatómicas da folha de duas espécies de *Brachiaria*. *Revista Agrociencia* 2: 21-30.

Rodella, R.A.; Ayoub, J. y Maimoni R.C. 1984. Estudio quantitativo de características anatómicas da folha de *Panicum maximum* Jacq. e *Panicum coloratum* L. *Revista Agrociencia*. (Piracicaba) 59: 163-74.

SAS. 1998. SAS User's Guide: Basics. Estadistic Análisis System. Institute. Cary, NC, USA.

Sierra, O.; Bedoya, J.; Monsalve, D. y Orozco, J. 1986. Observaciones sobre Colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L.) Camus) en la Costa Atlántica de Colombia. *Pasturas Tropicales*. 8(1): 6-9.

Tilley, J.M. y Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18: 104-111.

Twidwell, E.; Johnson, K.; Patterson, J.; Cherney, J. y Bracker, C. 1991. Degradation of switchgrass anatomical tissue by rumen microorganisms. *Crop Science* 30: 1321-1328.

- Van Soest P.J. y Wine, R.H. 1968.** Determination of Lignin and Cellulose in ADF With Permanganate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 51: 780.
- Van Soest, P.J., Robertson J. y Lewis, B. 1991.** Symposium: Carbohydrate Methodology, Metabolism and Nutritional Implications in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Ventrella, M.C.; Rodella, R.C. y Curi, P. 1997a.** Anatomia e bromatologia de espécies forrageiras de *Cynodon* Rich. I- Caule. In Reuniao Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 34, Juiz de Fora-MG. Anais da XXXIV Reuniao da SBZ. 2: 2-5.
- Ventrella, M.C.; Rodella, R.C. y Curi, P. 1997b.** Anatomia e bromatologia de espécies forrageiras de *Cynodon* Rich. II- Caule. In Reuniao Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 34, Juiz de Fora-MG. Anais da XXXIV Reuniao da SBZ. 2: 6-8.
- Waghorn, G.; John, W.; Jones, T. y Shelton, D. 1987.** Nutritive value of *Lotus corniculatus* L. Containing low and medium concentrations of condensed tannins for sheep. *Proceedings New Zealand Society and Production* 47: 25-30.
- Weimer, P.J. 1996.** Why don't ruminant bacteria digest cellulose faster? *Journal of Dairy Science* 79: 1496-1502.
- Wilkins, R.J. 1972.** The potential digestibility of cellulose in grasses and its relationship with chemical and anatomical parameters. *Journal of Agricultural Science* 78: 457-464.
- Wilson, J.R. 1973.** Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. II. Anatomy. *Australian Journal of Agricultural Research* 27: 355-364.
- Wilson, J.R. 1976.** Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. II. Anatomy. *Australian Journal of Agricultural Research* 27: 355-64.
- Wilson, J.R. 1983.** Effect of water stress on *in vitro* dry matter digestibility and chemical composition under tree crops. In: Ahmad Tajuddin Z. (ed.) *Proc. Int. Livestock-Tree Cropping Workshop*, Serdang, Malaysia. FAO. Roma. pp. 39-54.
- Wilson, J.R. 1993.** Organization of forage plant tissues. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. *et al.* (eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. pp. 1-32.
- Wilson, J.R.; Brown, R.H. y Windham, W.R. 1983.** Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> intermediate types of *Panicum* species. *Crop Science* 23(1): 141-146.
- Wilson, J.R. y Hattersley, P.W. 1989.** Anatomical characteristics and digestibility of leaves of *Panicum* and other grass genera of C<sub>4</sub> photosynthetic pathway. *Australian Journal Agricultural Research* 40(1): 125-136.
- Wilson, J.R.; McLeod, M.N. y Minson, D.J. 1989.** Particle size reduction of leaves of a tropical and a temperate grass by cattle. I. Effect of chewing during eating at varying times of digestion. *Grass and Forage Science* 44: 55-6.
- Wilson, J.R.; Deinum, B. y Engels, F.M. 1991.** Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 39(1): 31-48.
- Wilson, J. R. y D.R. Mertens. 1995.** Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science* 35: 251-255.
- Wilson, J.R. y Hatfield, R.D. 1997.** Structural and chemical change of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Australian Journal Agricultural Research* 48: 165-180.
- Wilson, J. R. y Kennedy, P.M. 1996.** Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fibre characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. *Australian Journal Agricultural Research* 47: 199-225.