

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**INTENSIDAD DE PASTOREO Y CONTENIDO DE TANINOS,  
DEGRADABILIDAD RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE  
*Parastrephia lepidophylla* (Wedd) CABRERA**

**Presentado por:  
JOSÉ ANTONIO HARO REYES**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGÍSTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Lima – Perú**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“INTENSIDAD DE PASTOREO Y CONTENIDO DE TANINOS,  
DEGRADABILIDAD RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE  
*Parastrephia lepidophylla* (Wedd) CABRERA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGÍSTER SCIENTIAE**

**Presentada por:  
JOSÉ ANTONIO HARO REYES**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Carlos Gómez Bravo  
**PRESIDENTE**

Ph.D. Enrique Flores Mariazza  
**PATROCINADOR**

Ph.D. Lucrecia Aguirre Terrazas  
**MIEMBRO**

Dra. María Elena Villanueva Espinoza  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

A mis amados padres y familia por su ejemplo de vida y amor incondicional, quienes me inspiran a luchar cada día.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONCYTEC por el financiamiento de mis estudios de Maestría y de mi tesis, gracias por apostar por los jóvenes profesionales.

Al Ph. D. Enrique Flores, patrocinador de mi tesis, por su acompañamiento desde el diseño del experimento, sus consejos durante el desarrollo y la motivación para sacar la tesis adelante.

Al Laboratorio de Ecología y Utilización de Pastizales y su equipo de trabajo, por su apoyo en el financiamiento y las actividades técnicas de la tesis.

Al Mg. Sc. Dante Pizarro por su apoyo incondicional en el cuidado, alimentación y ejecución de experimentos con las llamas.

A los MV. Marco García y M.V. Alicia López por hacerse cargo de la fistulación y pos-operatorio de las llamas.

A la Mg. Sc. Vivian Calvo, Jonatan Zevallos y Kiara García, por apoyarme en el cuidado de las llamas.

A la Dra. Teresa Arbaiza (UNMSM) por facilitarme información y consejos para el ensayo de degradabilidad, así como aceptar recibir a las llamas luego de finalizado el experimento.

Al Q.F. Víctor Miranda por su apoyo en el proceso de análisis fitoquímico de las muestras y su constante asesoría para el procesamiento e interpretación de resultados.

A mis queridos amigos quienes siempre estuvieron cerca para animarme en medio del arduo trabajo.

## INDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1.	<b>Interacciones Planta Herbívoro</b>	3
2.2.	<b>Teoría de Defensa de las Plantas</b>	4
2.2.1.	Hipótesis de las plantas “aparentes”	4
2.2.2.	Hipótesis de la defensa óptima	5
2.2.3.	Hipótesis balance carbono – nutriente	7
2.2.4.	Hipótesis balance de crecimiento – diferenciación	7
2.2.5.	Hipótesis de disponibilidad de recursos	9
2.3.	<b>Tipos de Defensa de las Plantas</b>	10
2.3.1.	Defensas físicas	10
2.3.2.	Defensas químicas	12
2.4.	<b>La Defensa Química en Arbustivas</b>	19
2.4.1.	Importancia ecológica	19
2.4.2.	Arbustivas en los Andes del Sur: <i>Parastrephia lepidophylla</i>	20
2.5.	<b>Mecanismos de Acción de los Compuestos Químicos Secundarios</b>	21
2.5.1.	Actividad tóxica	21
2.5.2.	Aversión o disuasión del consumo	21
2.5.3.	Anti-nutricionales	22
2.5.4.	Efectos positivos	23
2.6.	<b>Respuesta de los Herbívoros a las Defensas de las Plantas</b>	24
2.6.1.	Mecanismos de respuesta	24
2.6.2.	La degradabilidad y digestibilidad como indicadores de la respuesta de herbívoros	26
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
3.1.	<b>Caracterización del área experimental</b>	28
3.2.	<b>Ensayos experimentales</b>	28
	<b>Ensayo 1: Perfil fitoquímico de <i>P. lepidophylla</i></b>	28
	<b>Ensayo 2: Concentración de taninos por efecto de la intensidad de pastoreo en <i>P. lepidophylla</i></b>	30

<b>Ensayo 3: Degradabilidad ruminal y digestibilidad in vitro de</b> <i>P. lepidophylla</i>	34
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	41
<b>4.1. Ensayo 1: Perfil Fitoquímico de <i>P. lepidophylla</i></b>	41
<b>4.2. Ensayo 2: Concentración de Taninos por Efecto de la Intensidad de</b> <b>Pastoreo en <i>P. lepidophylla</i></b>	43
<b>4.3. Ensayo 3: Degradabilidad Ruminal y Digestibilidad <i>in vitro</i> de <i>P.</i></b> <i>lepidophylla</i>	46
<b>V. CONCLUSIONES</b>	51
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	52
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	53
<b>VIII. ANEXOS</b>	61

## INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Clasificación de los Compuestos Químicos Secundarios	13
Tabla N° 2: Componentes de las intensidades de pastoreo (tratamientos)	31
Tabla N° 3: Hipótesis lógicas para contrastes ortogonales en el ensayo del efecto de intensidades de pastoreo sobre la concentración de taninos	33
Tabla N° 4: Marcha fitoquímica	41
Tabla N° 5: Efecto de la intensidad de pastoreo en la concentración de taninos	44
Tabla N° 6: Efecto de la intensidad de pastoreo en la degradabilidad ruminal a las 48horas, coeficientes de degradabilidad y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca	46

## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Efecto de la interacción de la frecuencia de corte por el nivel de uso sobre la degradabilidad ruminal a las 48 horas (Prueba DLS,  $p < 0.05$ ) 49

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1: Caracterización del área experimental	62
Anexo N° 2: Caracterización físico - química del suelo	64
Anexo N° 3: Descripción del Sitio Experimental: Estación Quimsachata del INIA	65
Anexo N° 4: Proceso de adaptación y fistulación de llamas	66
Anexo N° 5: Protocolo de ensayo de degradabilidad ruminal en llamas.	68
Anexo N° 6: Salidas SAS del análisis de Covarianza para evaluar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la concentración de taninos	70
Anexo N° 7: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la concentración de taninos	74
Anexo N° 8: Salidas SPSS para cálculo de coeficientes de curvas de degradabilidad ruminal	78
Anexo N° 9: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la degradabilidad ruminal a las 48 horas	96
Anexo N° 10: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre los coeficientes de degradabilidad ruminal	98
Anexo N° 11: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la DIVMS	103
Anexo N° 12: Curvas de degradabilidad ruminal en incubación por 48 horas para <i>Parastrephia lepidophylla</i>	105
Anexo N° 13: Análisis de nutrientes y defensas físicas	106
Anexo N° 14: Calidad de Fibra Detergente Neutra en follaje de <i>P. lepidophylla</i> sometido a intensidades de pastoreo	107

## RESUMEN

En este estudio se analizó la interacción planta – herbívoro entre *Parastrephia lepidophylla* y las llamas, bajo la hipótesis que el pastoreo induce respuestas defensivas a nivel de compuestos químicos secundarios (CQS) en los arbustos y que estos afectarían la digestión del follaje al ser consumido por los herbívoros. La investigación se realizó en la Estación Quimsachata del INIA Puno y se dividió en 3 ensayos. El primero consistió en un perfil fitoquímico de *P. lepidophylla*. En el segundo se sometió a los arbustos a intensidades de pastoreo simuladas, combinando frecuencias de corte (30 y 60 días) por niveles de uso (25 y 50 % del follaje), además de un control sin cortar. El tercero consistió en evaluar la degradabilidad ruminal *in sacco* y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de *P. lepidophylla* en llamas. El ensayo 1 mostró que *P. lepidophylla* contiene flavonoides, triterpenos, fenoles, taninos, quinonas, azúcares reductores y aminoácidos. El ensayo 2 reveló que la frecuencia de corte disminuye la concentración de taninos (4.37 vs 4.77 g taninos totales/ Kg MS, 30 y 60 días respectivamente), mientras que en el ensayo 3 se encontró que es el nivel de uso el que afecta degradabilidad ruminal a las 48 horas o la DIVMS, siendo las degradabilidades de 65.49% y 63.25% y las digestibilidades de 46.27% y 41.41%, para niveles de 50 y 25% de uso respectivamente. Los resultados revelaron que hubo una interacción entre la frecuencia de corte y el nivel de uso sobre la degradabilidad. Se concluyó que los taninos no serían el mecanismo defensivo de *P. lepidophylla*, que los altos niveles de uso favorecen su degradación y digestibilidad en las llamas y que *P. lepidophylla* responde de manera específica en función a la intensidad de daño que recibe.

**Palabras Clave:** interacción planta-herbívoro, arbustivas, compuestos secundarios, taninos, llamas, intensidad de pastoreo

## ABSTRACT

This study focus on plant – herbivore interaction between *Parastrephia lepidophylla* and llamas under the hypothesis that grazing induces defensive responses in shrubs at plant secondary metabolites (PSM) level, and these PSM would affect foliage digestion when consumed by herbivores. The research was performed in Quimsachata Station at INIA Puno and was divided into 3 essays. The first one consisted in a phytochemical screening of *P. lepidophylla*. In the second one, the shrubs where applied simulated grazing intensities, which combined grazing frequencies (30 and 60 days) and utilization levels (25 and 50% of foliage), also a control without grazing. The third one evaluated *in sacco* rumen degradability and *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of *P. lepidophylla* in llamas. Essay 1 showed that *P. lepidophylla* constains flavonoids, triterpenes, phenols, tannins, quinones, redactor sugars and amino acids. Essay 2 probed that grazing frequency diminish tannin concentration (4.37 vs4.77 g Total Tannins/ Kg DM for every 30 and 60 days grazing respectively), while in essay 3 it is the utilization level which affects rumen degradability at 48 hours and IVDMD. Degradability results were 65.49% y 63.25% and digestibility results were 46.27% y 41.41%, both cases corresponding to 50 and 25% utilization levels. There is also an interaction between grazing frequency and utilization found among degradability means. In conclusion, tannins would not be the defensive mechanism of *P. lepidophylla*, the higher utilization levels would favor its degradation and digestibility in llamas and *P. lepidophylla* responds independently according to the damage intensity received.

**Key words:** plant-herbivore interaction, shrubs, secondary metabolites, tannins, llamas, grazing intensity

## I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, tenemos alrededor de 22 millones de hectáreas de pastizales (Flores, 1992), donde 15 millones pertenecen a la región Puna. El 41.5% de los pastizales de Puna son de condición pobre y un 39.3% de condición regular (Flores, 2013), lo que sugiere que existen problemas de manejo y que la carga estaría por debajo de su potencial. Es bajo estas condiciones donde se realiza la crianza de camélidos y los pastizales son su fuente de alimento (Catorci *et al.*, 2014), siendo en la mayoría de casos son su único sustento (Flores, 1992).

En nuestro país existen pastizales dominados por especies arbustivas, conocidos como tolares (Flores, 1992), que se distribuyen principalmente en la Sierra Sur, ocupando cerca de 2 millones de hectáreas de la región Puna (Flores, 2013). Los tolares son importantes por sus funciones ecosistémicas, fuente de principios medicinales, combustible y alimento para el ganado, en especial de los camélidos sudamericanos (Alzérreca *et al.*, 2002). Estas especies han demostrado consumir tolales entre el 9 y 28% de su dieta en época lluviosa (Genin *et al.*, 1994) y en el caso de llamas hasta un 71.5% durante la época seca, marcadamente superior al consumo de alpacas u ovejas (Flores, 1993). Estos niveles de consumo son sorprendentes considerando que las arbustivas poseen gran variedad de compuestos químicos secundarios, muchos de ellos con actividad defensiva ante el ataque de enfermedades, plagas o herbívoros y que actúan reduciendo el consumo y la digestibilidad en los predadores (Estell, 2010).

Los arbustales están tomando mayor importancia en el contexto mundial por su creciente expansión sobre otros ecosistemas de pastizal debido a múltiples factores, entre ellos el cambio climático (Brandt *et al.*, 2013). Los incrementos de temperatura y radiación así como la disminución de precipitaciones estarían potenciando el crecimiento de estas plantas y estimulando sus mecanismos de adaptación (Báez *et al.*, 2011).

Se calcula, en el marco del escenario A1B del IPCC para el cambio climático que la superficie de arbustales de la Puna del Perú pasaría de un 8.7% en el 2010 a un 18.2% (2040) y un 20.4% (2070), propiciado por los cambios en composición florística de los

ecosistemas a raíz de los incrementos de temperaturas y disminución de humedad y precipitación originadas por el cambio climático (Flores, 2013). Las predicciones apuntan al avance de los arbustales hacia altitudes más bajas donde la pendiente es más plana y la superficie del suelo menos rugosa, además de reducción de la fragmentación de la vegetación (Arnillas *et al.*, 2010).

Ante este probable escenario de expansión de arbustivas y su conocida actividad defensiva resulta necesario saber cómo interactuarán las tolas y los herbívoros, pues no se sabe hasta qué punto esta interacción podría limitar el uso de las tolas como recurso forrajero, ni en qué medida herbívoros como las llamas poseerían mecanismos adaptativos para lidiar con estos químicos.

Es por esta razón que el presente estudio busca generar información del efecto que el eventual pastoreo, simulado bajo diferentes intensidades, causaría sobre la interacción de una especie de tolar, *Parastrephia lepidophylla*, y un herbívoro doméstico, la llama (*Lama glama*). Se esperaría que el pastoreo estimule la respuesta defensiva de la tola, expresada en un incremento de concentración de un compuesto químico secundario, y que este compuesto, como un mecanismo de defensa, interfiera sobre la degradación y digestibilidad de la llama.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Interacciones Planta Herbívoro

Las interacciones planta – herbívoro constituyen la influencia mutua de las plantas y herbívoros sobre sus procesos biológicos. Dicha influencia puede ser de carácter antagónico como mutualista (Rhoades, 1979) y tiene un impacto tanto en la sobrevivencia de las especies, bajo procesos como la coevolución, como en la dinámica de las comunidades y los atributos del ecosistema (Rhoades, 1985; Bryant *et al.*, 1991). El carácter antagónico de las interacciones planta – herbívoro puede entenderse como una “guerra de armas” entre ambos, donde cada cual busca desarrollar mecanismos para sobrevivir o protegerse de los ataques del otro (Lambers *et al.*, 2008), siendo un claro ejemplo las defensas físicas y químicas de las plantas y los mecanismos de los herbívoros para evadirlas.

El carácter mutualista de las interacciones, en cambio, implica beneficios mutuos para las plantas y los herbívoros, estos se ven reflejados en las interacciones que favorecen la polinización y dispersión de semillas, donde las plantas usan compuestos químicos que producen colores y aromas que atraen a los polinizadores, estos aprovechan partes de la planta mientras cumplen la función de esparcir semillas (Rhoades, 1979).

La presencia de estas interacciones a lo largo de la historia de vida de las plantas y herbívoros influencia la evolución de las mismas, siendo responsables de la aparición y diversificación de especies bajo la forma de “coevolución”, la cual se entiende como una adaptación recíproca entre plantas y herbívoros donde por ejemplo las plantas desarrollan una defensa química para evitar ser consumidas, constiuyendo nuevas especies, pero posteriormente ciertos herbívoros desarrollan los mecanismos para inhibir estos compuestos y lograr consumir alimento en estos nichos que quedaron “abiertos” por un tiempo, en esa secuencia sucesiva de adaptación se van formando las especies de plantas y herbívoros (Futuyma, 2000).

Más allá de la visión de especies e individuos las interacciones logran configurar comunidades vegetales y alterar el ciclaje de nutrientes, por ejemplo en algunos casos

las plantas mejor defendidas (como las especies leñosas) logran dominar la comunidad vegetal pues los herbívoros consumen las plantas con menor defensa. Esto hace que las plantas bien defendidas compitan con ventaja por los nutrientes del suelo, limitando el crecimiento de especies palatables y si los herbívoros no consumen la plantas dominantes pueden migrar a otras áreas reduciendo su aporte de nitrógeno al sistema (Bryant *et al.*, 1991).

## **2.2. Teoría de Defensa de las Plantas**

La teoría de la defensa en plantas busca comprender los patrones de localización de las defensas químicas dentro de una misma especie vegetal y entre grupos poblacionales, con el objetivo de utilizar este conocimiento para predecir las defensas que una planta emplearía para evitar ser consumida por herbívoros (Kimball y Provenza, 2003).

Si bien existe un componente coevolutivo entre las defensas de las plantas y las estrategias de los herbívoros para consumirlas, estos no han sido los únicos agentes que han motivado la defensa, otros enemigos y las diversas condiciones abióticas han participado también en dicha evolución y las teorías de defensa deben tomarlos en cuenta (Stamp, 2003).

Existen numerosas hipótesis que intentan descifrar la dinámica de las defensas químicas, entre las más citadas y utilizadas tenemos: Hipótesis de las Plantas “Aparentes” (PAH), Hipótesis de la Defensa Óptima (ODH), Hipótesis del Balance Carbono – Nutriente (CNBH), Hipótesis del Balance entre Tasa de Crecimiento y Diferenciación (GDBH) e Hipótesis de la Disponibilidad de Recursos (RAH) o hipótesis de Tasa de Crecimiento (Kimball y Provenza, 2003; Stamp, 2003; Massad *et al.*, 2011).

### **2.2.1. Hipótesis de las plantas “aparentes”**

La PAH establece que las plantas pueden clasificarse en dos tipos: “aparentes” y “no aparentes”, en función al grado de visibilidad, facilidad de ser encontradas y abundancia tanto espacial como temporal, dentro de una comunidad vegetal (Fenny, 1976). Esta visibilidad de las especies vegetal determinará el tipo de defensas que puedan desarrollar.

La PAH predice que las plantas “aparentes” desarrollarán defensas cuantitativas o dependientes de la dosis, es decir que requieren gran concentración para tener efecto anti-herbívoro, mientras que las plantas “no aparentes” desarrollarán defensas cualitativas, que son tóxicas en bajas concentraciones (Kimball y Provenza, 2003). Las plantas “aparentes” espacialmente, es decir las más abundantes, están al alcance de cualquier herbívoro por ello requieren defensas cuantitativas que tienen efecto más universal e invierten sus recursos en ellas, en cambio las plantas “no aparentes” espacialmente son difíciles de encontrar por los herbívoros y por ello desarrollan defensas de menor costo que las protegen de herbívoros generalistas que eventualmente puedan atacarlas (Stamp, 2003). El aspecto temporal sigue la misma lógica, plantas de ciclo de vida corto o anuales no son “aparentes” no requieren tanta inversión en defensas porque entran y salen rápido de la comunidad vegetal, en cambio las plantas de vida larga o perennes justifican una alta inversión en defensas cuantitativas porque las usarán en su ciclo de vida (Kimball y Provenza, 2003).

La PAH se fundamenta en la estrategia de vida de las plantas, determinada por la selección genética, que determina la cantidad de recursos que pueden destinar a sus defensas, por ejemplo, plantas efímeras no podrían invertir sus recursos en defensas costosas pues deben crecer y diseminar semillas con rapidez (Fenny, 1976). Existe entonces un balance de los recursos entre las habilidades para escapar de los herbívoros (determinadas por las estrategias de vida) y entre los mecanismos de defensa (Kimball y Provenza, 2003).

La búsqueda de evidencia para esta hipótesis se ha limitado debido a la dificultad para medir en qué grado una planta es “aparente” o no lo es (Stamp, 2003) y al identificar plantas aparentes que no tenían defensas químicas, por lo que la hipótesis si bien fue un primer intento de explicar la defensa química en plantas, ha perdido impacto (Kimball y Provenza, 2003).

### 2.2.2. Hipótesis de la defensa óptima

La ODH está conformada por 2 hipótesis centrales. La primera establece que las defensas son una respuesta adaptativa de la planta en la búsqueda de alcanzar el mejor estado físico posible. La segunda expresa que las defensas son costosas porque comprometen el estado físico de la planta al usar recursos destinados originalmente a otras necesidades (Rhoades, 1979).

Estas hipótesis desencadenan una serie de predicciones: 1) las plantas más expuestas a la presión de herbívoros serán las que en su evolución inviertan más en sus defensas, 2) las defensas se localizarán en las partes de la planta que estén más expuestas al ataque de herbívoros y que contribuyan más a mantener el estado físico de la planta, 3) como las defensas son costosas, estas aumentarán ante el ataque de herbívoros pero se mantendrán en niveles basales en su ausencia, 4) las plantas en estrés ambiental serán menos defendidas pues destinarán energía y nutrientes a mantener su estado físico antes que a formar defensas (Kimball y Provenza, 2003; Stamp, 2003).

La ODH se fundamenta en que existe una variación genética en las defensas de las plantas (compuestos secundarios) que es determinada por la selección natural. El principal agente de selección es el herbívoro que fuerza la producción de defensas como adaptación de la planta para su sobrevivencia; entonces las defensas de la planta actúan limitando las poblaciones y ataque de los herbívoros. Asimismo, la producción de defensas implica costos en términos bioquímicos, es decir sustratos y enzimas, además de estructuras para su almacenamiento (vacuolas) y distribución (ductos de resinas), que muchas veces no pueden ser recuperados (por ejemplo hay poco recambio molecular en las defensas cuantitativas) aunque la selección ha ido favoreciendo la reducción de costos en la defensa, por ejemplo en el uso de vías metabólicas comunes para diversos procesos además de los defensivos (Stamp, 2003).

La ODH ha sido probada bajo diversos ensayos. Ante la ausencia de herbívoros se ha podido observar que las variedades de *Trifolium repens* carentes de compuestos cianogénicos tienen mucho mejor vigor vegetativo y reproductivo que las variedades cianogénicas (Rhoades, 1979), probando así que las defensas le cuestan a la planta parte de sus recursos para mantener un buen estado físico. Se ha observado que los órganos reproductivos de *Pastinaca sativa* son las partes de la planta más valiosas y más expuestas al ataque de herbívoros y que son las partes mejor defendidas por furanocoumarionos, confirmando que la defensa se concentra en partes expuestas e importantes (Stamp, 2003). Diversas especies como *Larix decidua*, *Betula pubescens*, *Picea sitchensis* han mostrado elevar sus defensas luego del ataque de herbívoros (o la simulación de este) y tener efectos negativos sobre herbívoros al consumir partes de la planta luego del ataque, comprobando así que las defensas son inducidas por el ataque de herbívoros. Lo opuesto ocurre cuando se somete a plantas como *Pteridium aquilinum* a un estrés ambiental como la sombra, reduciendo sus defensas (Rhoades, 1979), lo que

llevaría a pensar que derivarían sus recursos a cubrir sus necesidades básicas por falta de luz antes que defenderse.

### 2.2.3. Hipótesis balance carbono – nutriente

La CNBH establece que la proporción de carbono y nutrientes disponibles para una planta puede determinar cómo serán distribuidos dichos recursos en ella, es decir hacia qué procesos o funciones serán destinados. La expresión de las defensas químicas, al igual que otros procesos serán afectados por esta relación (Stamp, 2003).

Cuando las plantas experimenten escasa disponibilidad de nutrientes se favorecerá la producción de defensas basadas en carbono, pero si los nutrientes (en especial el nitrógeno) son abundantes se favorecerá la construcción de defensas nitrogenadas (Lerdau, 2002). Estas predicciones son aplicables sólo para el caso de plantas con distribución de defensas flexible, es decir las que se modifican priorizando los requerimientos de crecimiento. En el caso de plantas de defensas fijas, determinadas por la genética, estas mantendrán un nivel constante así falten o sobren recursos para el crecimiento (Stamp, 2003).

La hipótesis se fundamenta en que las deficiencias de nutrientes limitan el crecimiento más que la fotosíntesis, como no hay suficientes nutrientes para la formación de nuevo tejido y la fotosíntesis sigue formando carbohidratos estos son utilizados para la defensa química de compuestos basados en carbono. En cambio las deficiencias de carbono limitan la fotosíntesis y en consecuencia el crecimiento, así no se llega a utilizar todos los nutrientes disponibles para formar tejidos y terminan siendo usados para formar defensas basadas en nitrógeno por ejemplo (Bryant *et al.*, 1983).

Existen experimentos que demuestran y contradicen la CNBH (aunque principalmente por una mala interpretación), se ha demostrado que la fertilización con N así como someter a sombra a ciertas plantas incrementan la concentración de CQS nitrogenados (Stamp, 2003).

### 2.2.4. Hipótesis balance de crecimiento – diferenciación

La GDBH plantea que cualquier factor ambiental que desacelere el crecimiento más que la fotosíntesis aumentaría la disponibilidad de recursos para la generación de productos provenientes de procesos de diferenciación. Las plantas entonces enfrentan un dilema, si

derivar sus recursos al crecimiento para poder sobrevivir a la competencia entre especies o a la diferenciación para defenderse de los herbívoros y patógenos (Herms y Mattson, 1992).

Stamp (2003) explica las predicciones derivadas de la GBDH: 1) las plantas con recursos escasos limitan tanto el crecimiento como la fotosíntesis produciendo una cantidad moderada de metabolitos secundarios (defensas) en comparación al crecimiento que pueden lograr, 2) las plantas con una disponibilidad intermedia de recursos favorecen la diferenciación logrando el pico de producción de compuestos secundarios, pues tienen más productos de fotosíntesis que de nutrientes lo que limita la formación de nuevos tejidos pero deja recursos para las defensas, 3) las plantas con gran cantidad de recursos a su disposición favorecen el crecimiento mientras que su producción de compuestos secundarios estaría por debajo del pico logrado bajo un nivel intermedio de recursos, (4) la luz tendrá un efecto de acumulación en compuestos secundarios porque influencia la fotosíntesis más que el crecimiento, haciendo que los compuestos se produzcan a la misma tasa que el crecimiento.

El mecanismo subyacente de la GDBH se basa en la existencia de dos caminos para el desarrollo de las plantas a nivel celular, uno es el crecimiento y otro la diferenciación. El primero involucra los procesos de división y elongación celular en cualquier tejido de la planta, como hojas, tallo, raíces, etc., mientras que la diferenciación se refiere a procesos de maduración y especialización, como la producción de defensas (Kimball y Provenza, 2003). El crecimiento y diferenciación entran en un juego de distribución de los recursos disponibles para la planta entre ambos procesos que al interactuar con las fuerzas de selección (competencia entre plantas y el efecto de herbívoros) configura las estrategias de vida de las plantas (Herms y Mattson, 1992).

Las evidencias de esta hipótesis según Stamp (2003) no son completas, pero logran probar el aspecto ecológico de la misma. Al exponer a *Heterotheca subaxillaris* a 4 niveles de nitratos se encontró un patrón no lineal en la concentración de terpenos, cuyo pico se alcanzó en una concentración intermedia, lo mismo ocurrió en el caso del nivel de compuestos fenólicos en el tomate, quedando demostrada la influencia de la disponibilidad de recursos sobre los procesos de diferenciación expresada en los niveles de compuestos defensivos.

### 2.2.5. Hipótesis de disponibilidad de recursos

La RAH propone que los recursos del ambiente donde crecen las plantas determinan su hábito de crecimiento (rápido o lento) y esta característica influye directamente sobre la cantidad y tipo de defensas que desarrollarán (Coley *et al.*, 1985).

La RAH predice que en ambientes ricos en recursos prevalecen las especies de crecimiento rápido las cuales por su necesidad acelerada de crecer derivan la mayoría de recursos a esta función y pocos recursos a la defensa, en cambio en ambientes pobres en recursos abundarán las especies de crecimiento lento que sí distribuyen mayores recursos para la defensa (Stamp, 2003). También se predice el tipo de defensa, las plantas de crecimiento lento y que poseen hojas de vida larga contienen predominantemente defensas cuantitativas mientras que las plantas de crecimiento rápido defensas cualitativas (Massad *et al.*, 2011).

La RAH se fundamenta en que los costos de las defensas se encuentran en una dinámica de compensación con los costos de crecimiento, es decir la inversión en defensas está justificada sólo si no supera el costo del daño causado por los herbívoros (Kimball y Provenza, 2003). Bajo este enfoque la cantidad y tipo de defensas tienen su razón de ser, si las plantas han evolucionado en ambientes de recursos escasos y su crecimiento es lento, es más económico para ellas tener defensas cuantitativas y de poca movilidad que perdurarán toda la vida de la hoja (que es una vida larga) y cuyo costo de haberse producido se compensará a lo largo del tiempo, en cambio las plantas de crecimiento rápido que tienen abundancia de recursos no tienen por qué invertir en defensas de largo plazo, más bien generan defensas cualitativas móviles que tienen bajo costo, alta efectividad y pueden degradarse y usarse en otras funciones de la planta (Coley *et al.*, 1985).

Stamp (2003) señala que un experimento con 47 especies de árboles jóvenes se demostró la existencia de una correlación negativa entre la tasa de crecimiento y el contenido de taninos y una correlación positiva entre el daño por herbívoros y la tasa de crecimiento, es decir las especies de crecimiento lento estaban mejor defendidas, probándose tanto en el contenido de compuestos secundarios como en el efecto real de las defensas sobre los herbívoros.

A pesar de los numerosos estudios a favor y en contra, la influencia de los herbívoros en el desarrollo evolutivo de los compuestos químicos secundarios en las plantas es

inegable, así como la actividad de dichos compuestos en la selección de herbívoros y sus impactos principalmente negativos en la condición física de los animales (Agrawal y Weber, 2015).

Es claro que las hipótesis de defensa de las plantas tienen limitaciones y resultan consistentes o no dependiendo de cada caso particular, sin embargo Kimball y Provenza (2003) señalan que hay 3 conceptos de gran importancia entre ellas: 1) las defensas se han desarrollado por evolución y son transmitidas a las generaciones, 2) las defensas implican costos que se cargan al metabolismo y 3) los factores ambientales juegan un papel en la determinación de la distribución y cantidad de defensas.

### **2.3. Tipos de Defensa de las Plantas**

Las estrategias defensivas de las plantas se clasifican en tres categorías (Gong y Zhang, 2014): características de resistencia, mecanismos de tolerancia y estrategias de escape. La “resistencia” se basa en las características físicas químicas y biológicas usadas por las plantas para reducir la cantidad del daño causado por herbívoros. La “tolerancia” se basa en los mecanismos de la planta para reducir los efectos negativos del daño sobre su estado físico, es decir que el impacto del daño no sea tan fuerte. El “escape” consiste en las estrategias para reducir la probabilidad de ser encontradas por los herbívoros. Toda planta posee más de una característica defensiva.

La presente revisión se basa en las características de resistencia con énfasis en la naturaleza de la defensa, ya sea física o química.

#### **2.3.1. Defensas físicas**

Las defensas físicas hacen referencia a las modificaciones morfológicas y estructurales en las plantas como reacción al ataque de herbívoros (Gong y Zhang, 2014). Según Laca *et al.* (2001) estas defensas logran reducir la producción animal y deprimir el estado de salud de los herbívoros y las ha clasificado en función al nivel en que pueden observarse sus efectos, actuando sobre la ingestión, la digestión y la calidad del producto animal.

Las defensas físicas impiden o reducen las posibilidades de ingestión bajo tres formas: disminuyendo el nivel de éxito en la búsqueda de plantas, reduciendo la habilidad de cosecha o prolongando el tiempo de masticación.

El éxito o fracaso para encontrar una planta depende de su cripticidad, que es el grado de dificultad que presenta para ser encontrada por los herbívoros debido a su tamaño y distribución errática en el paisaje (Fenny, 1976). De esta manera las plantas difíciles de encontrar obligan a los animales a consumir poca cantidad de ellas por bocado pues se encuentran aisladas sin formar parches de vegetación y al hallarse distanciadas su búsqueda es más dificultosa (Laca *et al.*, 2001).

La reducción en la habilidad de cosecha ocurre cuando las plantas presentan estructuras de canopia que limitan el tamaño de bocado de los herbívoros, es decir arbustos con follaje poco denso o pastos pequeños y esparcidos, pues los animales buscarán alimentarse de las plantas que les provean de mayor biomasa por bocado para hacer más eficiente su pastoreo, también la fenología impactará en la selección dentro de la estructura de la canopia, pues plantas más maduras tienen menor contenido nutricional y esto fuerza a los animales a seleccionar los tejidos más nutritivos reduciendo su tasa de cosecha de forraje (Laca *et al.*, 2001).

Otra causa de reducción en la habilidad de cosecha es la presencia de espinas, aguijones y tricomas, que son modificaciones de las hojas o tallos de las plantas que limitan el consumo al ser evitadas por los herbívoros por el daño físico que pueden causarles, al lacerar su cuerpo, boca o encías, reduciendo así la preferencia por estas plantas y/o el tamaño de bocado, forzándolos a tener mayor selectividad al comer, teniendo que hacerlo hoja por hoja y ampliando así el tiempo de pastoreo (Hanley *et al.*, 2007).

El tiempo de masticación puede verse afectado por el contenido de fibra del forraje y específicamente de FDN (a más FDN menor consumo) pues los forrajes más fibrosos fuerzan a los animales a masticar por un mayor tiempo, reduciendo la eficiencia de cosecha, incrementando el tiempo que deben pastorear para cubrir sus requerimientos o haciéndolos seleccionar los forrajes menos fibrosos (McLeod y Smith, 1989).

La digestibilidad de la dieta puede verse afectada por defensas físicas como el sílice, que es un mineral que se acumula en las plantas y puede afectar negativamente los microorganismos del tracto digestivo así como la absorción del nitrógeno, además por su estructura deprime el consumo pues puede lacerar el esmalte de la dentadura de los herbívoros produciendo desgaste (Massey y Hartley, 2006; Soininen *et al.*, 2013).

A nivel de calidad de producto las heridas originadas por el contacto con espinas y callos pueden dejar marcas en la piel que dañan productos para peletería así como laceraciones a nivel de la boca o el esófago que pueden desencadenar en infecciones, afectando la salud de los animales y por ende reduciendo la calidad y cantidad de

cualquiera de sus productos. Asimismo, las semillas espinosas pueden prenderse de la lana reduciendo su calidad para venta (Laca *et al.*, 2001).

Muchos de estas defensas físicas son en realidad respuestas adaptativas a otros factores de estrés ambiental como la radiación UV, patógenos o estrés hídrico y no provienen directamente de la interacción con herbívoros, sin embargo se han constituido como importantes mecanismos de defensa (Hanley *et al.*, 2007).

### 2.3.2. Defensas químicas

Las defensas químicas son los productos del metabolismo secundario de las plantas, conocidos como compuestos químicos secundarios (CQS), que se hayan distribuidos de manera variable en las partes de las plantas y que al ser consumidos que actúan sobre la fisiología de los herbívoros como toxinas o antinutrientes cuyo efecto final es disuadir a los herbívoros de consumirlas (Kimball y Provenza, 2003).

Conocer las estructuras de cada CQS podría darnos una idea del tipo de actividad defensiva del compuesto, mientras que su identificación y cuantificación ayudarán a saber que tan defendida se encuentra una planta, así como reconocer la influencia de herbívoros y factores ambientales en su dinámica.

#### a. Compuestos químicos secundarios (CQS)

Son compuestos de bajo peso molecular con amplia diversidad de estructuras químicas, abarcan más de 100 000 estructuras estudiadas y su síntesis es propia de cada especie vegetal, es decir cada planta sintetiza ciertos CQS particulares (Wink, 2010).

La denominación de compuestos químicos “secundarios” data de fines del siglo XIX, cuando se pensaba que el metabolismo secundario era responsable de generar sub-productos, deshechos o productos para almacenaje, a diferencia del metabolismo primario que sintetizaba y degradaba compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. A partir de los 50's se reconoce que los productos del metabolismo secundario actúan como compuestos de señalización química en el ecosistema, es decir son responsables de la interacción de las plantas con su ambiente, siendo indispensables para la su supervivencia (Hartmann, 1996).

b. Clasificación de compuestos

La mayor parte de autores reconocen tres grandes grupos de CQS: terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados, diferenciados por sus particularidades en estructura química, función y rutas de biosíntesis (Crozier *et al.*, 2006, Taiz *et al.*, 2015, Kabera *et al.*, 2014). En el Tabla N° 1 se encuentran algunos compuestos representativos de cada uno de estos grupos.

**Tabla N° 1: Clasificación de los Compuestos Químicos Secundarios**

<b>Terpenoides</b>	<b>Compuestos Fenólicos</b>	<b>Compuestos Nitrogenados</b>
Terpenos - Monoterpenos (volátiles) - Sesquiterpenos (volátiles) - Diterpenos - Triterpenos - Tetraterpenos (ej. carotenoides) Esteroles	Ácidos fenólicos Flavonoides (ej. antocianinas, flavonoles, isoflavonas) Cumarinos Ligninas Taninos	Alcaloides Glucocinolatos

*Elaborado en base a Agostini-Costa et al. (2012).*

Otras formas de clasificar los CQS hacen referencia exclusiva a la presencia de nitrógeno en su estructura: Nitrogenados y No Nitrogenados, o también respecto a su naturaleza hidrofílica o lipofílica, pues esta característica facilita su almacenamiento en diferentes estructuras dentro de la planta. Wink (2010) señala que los CQS hidrofílicos se encuentran mayormente en vacuolas, lactíferos, apoplastos y paredes celulares, mientras que los lipofílicos se hallan comúnmente en la cutícula, tricomas, ductos de resinas, lactíferos, células aceitosas y membranas de plástidos.

### c. Los taninos y su actividad defensiva

Los taninos son compuestos polifenólicos localizados en las hojas, flores, frutos y leña de diversidad de planta, inicialmente conocidos por su propiedad de curtir pieles, tienen la propiedad de enlazarse principalmente a las proteínas solubles y en menor grado forman complejos con ácidos nucleicos y polisacáridos. De acuerdo con su estructura, peso molecular y solubilidad en agua existen 4 grupos de taninos: proantocianidinas (taninos condensados), taninos hidrolizables, oxitaninos y  $\beta$ -taninos (Swain, 1979).

Los taninos hidrolizables son ésteres de ácidos fenólicos (ej. ácido gálico o elágico) y un poliol que puede ser la glucosa, pueden seguir esterificándose para formar taninos más complejos (Lamy *et al.*, 2011).

Los taninos condensables son los compuestos fenólicos más abundantes en forrajes, arbustos y árboles a comparación de los taninos hidrolizables. Estructuralmente son oligómeros o polímeros de unidades flavonoides (ej. flavan-3-oles como catequinas y epicatequinas) unidas generalmente por enlaces C-C (Min *et al.*, 2003).

Existen 2 vías para la síntesis de taninos: la vía del ácido shikímico (importante en plantas) y la vía del ácido malónico (hongos y bacterias). La vía shikímica se alimenta de azúcares de glucólisis y vía de pentosas (Taiz *et al.*, 2015). Toma dos caminos para la síntesis de taninos, una que conduce a la síntesis del ácido gálico hasta llegar a los taninos hidrolizables y otra que conduce a la síntesis de aminoácidos aromáticos que darán los esqueletos carbonados para los taninos condensados (Crozier *et al.*, 2006).

Los taninos se enlazan con proteínas empleando enlaces puente de hidrógeno, pero también pueden utilizar uniones covalentes previa oxidación (Taiz *et al.*, 2015). La duración de este enlace dependerá del tamaño y forma del tanino así como la tasa tanino/proteína en que se de la unión (Barbehenn y Constabel, 2011).

Tanto los taninos hidrolizables como los condensados tienen efectos anti-nutricionales y tóxicos en los animales, sin embargo los hidrolizables tienden a ser degradados y sus productos absorbidos con facilidad siendo causantes de toxicidad (Acamovic y Brooker, 2005), mientras que los condensados son poco absorbibles y se les atribuye efectos negativos en la digestión y absorción de proteínas (Estell, 2010).

La actividad de taninos condensados ha sido clasificada en función a su concentración en la planta, si esta se encuentra entre los 2 – 4% de MS ayuda a proteger proteínas incrementando la disponibilidad de aminoácidos pero si se encuentra de 6 – 12% de MS

reduce el consumo, digestión y el crecimiento del ganado (Barbehenn y Constabel, 2011).

#### d. Determinación y cuantificación de CQS

Existen análisis para determinar la variedad de metabolitos existentes en una planta llamadas marchas fitoquímicas preliminares y otros que los cuantifican, conocidos como análisis fitoquímicos (Lock, 2001).

Cuando se realizan marchas fitoquímicas los CQS son extraídos en un solvente orgánico o en agua. La extracción puede ser vía maceración, extracción con soxhlet, arrastre de vapor, percolación, entre otros métodos. Una vez que se tienen los extractos se someten a “test” químicos que utilizan reactivos particulares para cada grupo de compuestos, estos “test” forman precipitados con coloraciones particulares en función a la presencia del compuesto (Tiwari *et al.*, 2011). Por ejemplo, los test de Dragendorff, Wagner y Mayers se usan para detectar alcaloides, mientras que el test de Gelatina se usa para detectar taninos.

En el caso de la cuantificación de compuestos, luego de la extracción son sometidos a un proceso de extracción y purificación, que utiliza diversidad de métodos cromatográficos. Finalmente la determinación estructural se realiza bajo diferentes formas de espectrometría, ya sea de masas, UV-visible, Infrarroja, resonancia magnética nuclear (REM) o por difracción de rayos X (Lock, 2001).

#### e. Factores que modifican las defensas químicas

Existen diversidad de factores que modifican la presencia y concentración de los CQS en las plantas, estos pueden ser inherentes a las plantas, como el estado fenológico, partes diferentes de una misma planta, o la edad, o también externos como la luz, temperatura, sequía, salinidad, ubicación geográfica o ataque de herbívoros y patógenos (Pavarini *et al.*, 2010). A este amplio grupo de factores se le suman las diferencias individuales a pesar del alto grado de parentesco (Hartmann, 1996; Wink, 2010).

Las plantas modifican su perfil de CQS a lo largo de las etapas de su vida (ontogenia o fenología) y lo hacen de manera diferente según el grupo funcional al que pertenecen. En el caso de árboles y arbustivas, existe un gran incremento de CQS durante la

germinación y establecimiento, sin embargo en los estados de madurez las defensas decrecen durante la etapa reproductiva (Barton y Koricheva, 2010).

El efecto de una mayor exposición a radiación UV o exposición prolongada a la luz solar ha demostrado estimular la producción de antocianinas, flavonoides y otros derivados fenólicos en diversas especies, siendo consistente con el rol de defensa contra la radiación UV que confieren compuestos de estos grupos (Pavarini *et al.*, 2010). Desde otra perspectiva, la reducción en la provisión de luz puede disminuir los compuestos fenólicos como en *Flourensia cernua*, un arbusto del desierto de Chihuahua (Estell *et al.*, 2016), así como el nivel de taninos en las plantas, a pesar que especies adaptadas a la sombra tienden a tener mayor concentración de estos CQS (Lerdau 2002).

El estrés por frío (7 – 10°C vs 15 – 28°C) ha demostrado reducir la producción de compuestos fenólicos en hojas de *Vitis vinifera* L. y al mismo tiempo su capacidad antioxidante, sin embargo las tendencias en la respuesta de los compuestos fenólicos al frío son variables, algunas especies los incrementa mientras otras los mantienen constantes, interpretar las razones resulta complicado pues interactúan las diferentes intensidades, duración y etapa fenológica en que se sitúa el estrés (Król *et al.*, 2015).

Las condiciones de sequía, en general acompañadas de altas temperaturas y radiación, provocan incrementos en el contenido de flavonoides y de ácidos fenólico, y en plantas resistentes a la sequía tienden a acumular antocianinas (Akula y Ravishankar, 2011).

Los CQS se encuentran en un proceso de síntesis y degradación continua, de modo que pueden tener una alta movilidad como moléculas sin alterar necesariamente su concentración en la planta. El tiempo que le toma a un CQS ser degradado y sintetizado nuevamente se conoce como tasa de recambio. Los compuestos que pasan por este proceso de recambio de manera continua y rápida se les denomina móviles, viviendo sólo horas o algunos días, como en el caso de ciertos terpenos y alcaloides, cuyos componentes pueden ser recuperados cuando la hoja senece; mientras que otros compuestos como los polifenoles son inmóviles, es decir se recambian hasta cierta etapa de la vida de la hoja y luego su recambio se detiene, permaneciendo acumulados, sin que la planta incurra en mayores costos para mantenerlos (Coley *et al.*, 1985).

#### f. Efecto del pastoreo en la dinámica de los CQS

Las plantas muestran diferentes mecanismos de respuesta en función a la forma de ataque de herbívoros. Si se produce remoción de tejido las plantas movilizan y redistribuyen sus recursos, como el C y N, pero si se produce solamente daño (poco estudiado en mamíferos), este produce una cascada de reacciones químicas de bioseñalización en el corto plazo, principalmente a través de los ácidos jasmónico y salicílico (Iason, 2005). El efecto del pastoreo por mamíferos herbívoros se enfoca en el primer caso y la movilización de recursos desencadenará los cambios en la dinámica de CQS.

##### *Efecto del pastoreo en el corto plazo*

Estell et al. (1996) sugieren que las defensas anti-herbívoro son mucho más efectivas en el corto plazo, debido a los compuestos producidos en respuesta al ataque de herbívoros son de vida corta y la persistencia del pastoreo intenso sobre los mismos arbustos año a año. Este razonamiento es consistente con el incremento de polifenoles y taninos condensados de *Acacia nigrescens* Oliv. en las hojas remanentes sólo 20 minutos después del pastoreo (Hay y Brown, 1992). Dichos incrementos inmediatos en los taninos condensados luego del pastoreo son mucho mayores cuando el tiempo de pastoreo sobre la planta es mayor y las concentraciones normales no se recuperan hasta 66 horas después como en el caso de *Acacia nigrescens* al ser pastoreada por jirafas (Furstenburg y van Hoven, 1994). Esto muestra que los efectos del pastoreo si bien pueden ser inmediatos no necesariamente duraderos, como se observó en las hojas remanentes de *Acacia karroo* 10 días después de un pastoreo intenso con cabras, cuya concentración de taninos condensados no cambió, aunque Scogings y Mopipi (2008) sugieren que pudo deberse a una interacción con la precipitación anual ya que en ensayos previos sí se encontraron diferencias.

##### *Efecto del pastoreo en el largo plazo*

El efecto del pastoreo moderado con cabras sobre arbustivas mediterráneas, por ejemplo, muestra una gran variabilidad en la dinámica de fenoles y taninos condensados. Después de 4 años de pastoreo se comparan los contenidos de estos CQS

en plantas en el área pastoreable contra plantas en excluidores encontrándose que los taninos condensados disminuyen hasta en 17.2% y aumentan hasta 30.8% su concentración respecto a los no pastoreados, además el efecto del pastoreo interactúa con la estación del año, dando patrones de incremento y caída de concentraciones diferentes para cada especie arbustiva (Mancilla-Leytón *et al.*, 2014). Esta variabilidad inter-específica se observa también en árboles y arbustos de la sabana semi-árida africana, donde sólo 1 de 4 cuatro especies clave mostró una disminución en taninos condensados por efecto del pastoreo con herbívoros después de una experimentación por 6 años (Scogings *et al.*, 2013).

#### *Efecto de la carga animal e intensidad de pastoreo*

La carga animal en un experimento de pastoreo con rumiantes pequeños (ovejas y cabra) ha demostrado ser un factor que incrementa proporcionalmente el contenido de taninos de *Periploca laevigata*, aumentando la concentración de este compuesto en 1.20, 1.97 y 3.29% MS al exponer a la planta a cargas de: 0.00, 0.34 y 0.50 animales/ha (Barroso *et al.*, 2003). Sin embargo, la carga podría afectar de manera diferente la dinámica de los CQS de una planta dependiendo del tiempo que permanezca el ganado, el periodo de descanso del pastizal y el esquema de rotación que influirán en la intensidad con la que la vegetación sufre el ataque de los herbívoros.

La intensidad de pastoreo, en el marco del presente trabajo, se manifiesta en dos componentes la frecuencia de pastoreo y el nivel de uso. El primero explica cada cuanto tiempo se introduce el ganado en una cancha de pastoreo mientras que el segundo se refiere al porcentaje del material vegetal previo a la introducción de animales que se permitirá que sea consumido.

Arbustos de *Periploca laevigata* que fueron pastoreados de manera simulada, con un nivel de uso del 50%, bajo diferentes frecuencias de corte (2 veces en 2 meses vs. 1 vez en el segundo mes) no mostraron diferencias en el contenido de taninos entre ellos, sin embargo, su concentración sí fue superior respecto a plantas que no habían sufrido pastoreo (Barroso *et al.*, 2003). Un efecto opuesto ocurre con los taninos condensados de *Combretum apiculatum*, una especie de árbol sudafricana sometida a diferentes niveles de exclusión de herbívoros (que equivaldrían a diferentes intensidades) mostrando la menor concentración en el tratamiento completamente expuesto al ataque

de herbívoros (el más intenso), comparado con aquellos de exclusión parcial o total, 70 vs. 95 y 85 mg Eq-Taninos de Sorgo/ g MS, respectivamente (Scogings *et al.*, 2013).

La respuesta al nivel de uso, afecta de manera diferente a los CQS dentro de un mismo grupo. En el caso de los terpenos del arbusto *Flourensia cernua* DC, se observa que el  $\alpha$ -pineno y el flourensadiol decrecen con mayores niveles de uso (Alto uso: > 50% nivel de uso a la mitad del periodo de pastoreo vs. Bajo Uso: <50% al final del pastoreo), mientras que el cis-jasmone y el trans-nerolidol se comportan de manera opuesta (Estell *et al.*, 1996).

## **2.4. La Defensa Química en Arbustivas**

### **2.4.1. Importancia ecológica**

Las plantas arbustivas se caracterizan por contar con altas defensas anti-herbívoro, tanto físicas como químicas (Papachristou *et al.*, 2005; Estell, 2010). Las defensas químicas están compuestas de una gran variedad de CQS, siendo una característica que le da competitividad a estas plantas en un medio hostil y haciendo que su consumo sea bajo a moderado, conformando sólo una pequeña parte de la dieta de animales al pastoreo a pesar de ser fuente considerable de proteína y energía (Estell, 2010).

Los arbustos cumplen un rol fundamental en la provisión de forraje en las zonas áridas y semi-áridas, donde la época seca es prolongada y las condiciones ambientales son duras, resultando imprescindibles para la sostenibilidad de sistemas ganaderos como el de pequeños rumiantes (Papachristou *et al.*, 2005).

Algunos de los CQS se han desarrollado como respuesta evolutiva al pastoreo, sin embargo no todos estos compuestos tienen propiedades defensivas o no proporcionan una defensa total, pues los herbívoros también han desarrollado mecanismos para lidiar con ellos, por ello existen arbustos más consumidos que otros (Bryant *et al.*, 1991).

En consecuencia, el conocimiento de los CQS que afectan la calidad nutritiva de las arbustivas se vuelve fundamental para la implementación de mejores estrategias de manejo en estos ecosistemas (Papachristou *et al.*, 2005).

#### 2.4.2. Arbustivas en los Andes del Sur: *Parastrephia lepidophylla*

*Parastrephia lepidophylla* es una planta arbustiva resinosa de olor característico, muy abundante en la zona de cordillera del Sur del Perú y con una gran importancia económica como fuente de leña para combustible y panadería así como por sus propiedades cicatrizantes (Reynel 1988). Además, se constituye como una de las especies dominantes de los tolares o arbustales del altiplano andino árido y semiárido, que son ecosistemas nativos para el pastoreo del ganado (Genin y Alzérreca 2006).

Su distribución comprende los andes del Perú (Lima, Ayacucho, Arequipa, Moquegua, Tacna, Cuzco, Puno), Bolivia, Chile y Argentina, en zonas secas y rocosas con alturas entre los 3440 y 4500 msnm (Nesom 1993).

Posee hojas escuamiformes de 3 a 4 mm de largo, que crecen adosadas a las ramas (imbrincadas). Las flores son dimórficas, presentando flores femeninas y hermafroditas, miden 0.7 cm, son de color amarillo blanquecino y están dispuestas en inflorescencia (Paca et al. 2003).

Esta planta, de acuerdo con su respuesta a la presión del pastoreo se clasifica como una especie decreciente (D), dentro de los ecosistemas de tolar, e invasora tipo 1 (I-1) en ecosistemas de pajonal en Puna seca (Flores y Oscanoa 1992).

Genin y Tichit (1997) evaluaron la degradabilidad ruminal *in sacco* a las 48 horas de *P. lepidophylla* encontrando que tenía un 78.8% en la época de lluvias y 82.3% en la época seca.

En hojas de *P. lepidophylla* boliviana se han encontrado flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides, y se ha descartado la presencia de alcaloides y saponinas. Los flavonoides son los compuestos secundarios de mayor presencia en dicho estudio (Rodrigo et al., 2010).

Dentro de las investigaciones realizadas en CS en plantas de la tribu Asterae, a la que pertenece el género *Parastrephia*, se encuentra mayor información sobre el estudio de diterpenos, flavonoides y coumarinos en esta tribu (Alvarenga et al. 2001)

La diversidad fitoquímica es amplia en arbustivas de zona sur. *Baccharis latifolia* y *B. papilosa* contienen saponinas pero no taninos a diferencia de *P. lepidophylla*, mientras que *Tetraglochin cristatum* contiene abundantes taninos, regular cantidad de triterpenos y flavonoides y escasas saponinas (Rodrigo et al. 2010).

## 2.5.Mecanismos de Acción de los Compuestos Químicos Secundarios

Desde un punto de vista de la alimentación al pastoreo, se reconoce a los CQS como factores anti-nutricionales por su capacidad de influir en el crecimiento y producción del ganado, desde la reducción de beneficios digestivos hasta la actividad tóxica que deriva en formación de aversiones (Launchbaugh *et al.*, 2001). El verdadero impacto que los CQS tengan sobre la nutrición o salud de los animales será resultado no sólo de su naturaleza química, sino de su concentración en dieta, la cantidad consumida, la actividad gastrointestinal, la absorción, transformación y excreción (Acamovic y Brooker, 2005).

### 2.5.1. Actividad tóxica

Los compuestos tóxicos en plantas constituyen aquellos que originan daños neurológicos, metabólicos y teratogénicos, causan severas pérdidas en la producción y no necesariamente influyen en los hábitos de consumo (Launchbaugh *et al.*, 2001). Sin embargo, los hábitos de consumo sí estarían influenciados principalmente por el efecto tóxico de los compuestos y no por efectos anti-nutricionales (Bryant *et al.*, 1991).

Por lo general las toxinas actúan luego de su absorción por propiedades lipofílicas que les permiten unirse a las membranas celulares y ocasionar daños en ellas o traspasarlas y actuar al interior de la célula, pudiendo ocasionar efectos carcinogénicos y daños mortales como el caso de ciertos alcaloides y ácido tánico (Iason, 2005).

Son pocas las plantas de los pastizales nativos del Perú que hayan sido reportadas como tóxicas en la literatura, sin embargo es bastante conocida la toxicidad del *Lupinus ballianus* que afecta a las vacas y ovejas que lo consumen (Reynel, 1988) y del *Astragalus garbancillo* y otras especies del mismo género que afectan el sistema nervioso del ganado que las consume, llegando a causar la muerte en ovinos y equinos, este efecto se le atribuye al selenio, pues tiene la propiedad de acumular este mineral, además tiene alto contenido de alcaloides (Tapia, 1971).

### 2.5.2. Aversión o disuasión del consumo

Existen sustancias tóxicas que actúan sobre los centros eméticos (en el mesencéfalo y tronco cerebral) desencadenando náuseas y vómitos. Al sentir estos síntomas e

identificar el alimento del que provienen el animal irá formando la aversión por los efectos pos-ingestivos de su dieta. Entre los compuestos que causan estos efectos se encuentran los taninos condensados, aceites esenciales, alcaloides, terpenos y oxalatos. La aversión puede ser temporal o permanente dependiendo de la dosis de la toxina y el momento y la forma en que esta afecta el cerebro o el tracto intestinal del animal, pues por lo general las aversiones se forman cuando los efectos post-ingestivos ocurren dentro de las 24 horas del consumo (Launchbaugh *et al.*, 2001).

Los olores de las plantas, en combinación con la identificación visual que hacen los herbívoros constituyen un mecanismo pre-ingestivo para formar aversión por una determinada especie de planta, así el animal aprende de la madre y sus contemporáneos a relacionar el aroma con el aspecto que la planta que los demás evitan consumir (Provenza *et al.*, 1992).

Como ejemplos de CQS que provocan aversiones o disuaden el consumo se encuentran los sesquiterpenos, glucósidos cianogénicos, alcaloides, flavonoides y saponinas, los cuales confieren un sabor amargo, así como los taninos un sabor astringente y los herbívoros tienden a evitar este tipo de sabores (Rogosic *et al.* 2008). Es probable que plantas como *Nothoscordum andicola*, *Erodium cicutarium* y *Lupinus chlorolepis*, que habita zonas rocosas de los andes peruanos, contengan alguno de estos compuestos, pues son poco palatables para el ganado debido a su sabor amargo (Tapia, 1971).

### 2.5.3. Anti-nutricionales

La actividad anti-nutricional de los CQS se da por (1) formación de complejos insolubles con los nutrientes consumidos, por (2) inhibición de la actividad de enzimas digestivas o por (3) acción directa sobre microorganismos del rumen, colon o ciego que facilitan la digestión (Launchbaugh *et al.*, 2001; Iason, 2005).

Los taninos son compuestos que actúan en las 3 formas mencionadas, siendo más conocida su capacidad de unirse a proteínas, limitando su absorción. Como consecuencia logran reducir la palatabilidad y consumo, la digestibilidad de proteínas y materia seca, la disponibilidad de nutrientes y la ganancia de peso (Launchbaugh *et al.*, 2001; Makkar, 2003; Rogosic *et al.*, 2008; Estell, 2010).

Los terpenos han mostrado reducción en la digestibilidad por su actividad antimicrobiana respecto de los microorganismos del rumen en experiencias *in vitro*, sin embargo parece no haber consistencia de este resultado *in vivo* (Papachristou *et al.*, 2005; Estell, 2010).

Esto podría explicarse por la volatilización de compuestos durante la masticación y rumia, el eructo o absorción en el rumen (Rogosic *et al.*, 2008).

En el caso de otros CQS, los compuestos resinosos y la lignina pueden ligarse a otros nutrientes haciéndolos insolubles, mientras que los inhibidores de tripsina afectan la actividad de esta enzima en especial en monogástricos (Launchbaugh *et al.*, 2001).

#### 2.5.4. Efectos positivos

A pesar que en general la actividad de los CQS se considera perjudicial para la producción animal, cuando ciertos compuestos son consumidos a bajas concentraciones y en la mezcla correcta llegan a tener efectos benéficos en la nutrición y la salud de los animales (Provenza y Villalba, 2010; Estell *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los animales pueden seleccionar su dieta considerando los CQS que les ayuden a regular su equilibrio interno (homeostasis). La posibilidad de que un animal utilice selecciones un CQS se basa en un balance entre los costos de detoxificarlo y los costos de permanecer en la condición que afecta su homeostasis, por ejemplo una enfermedad. Los CQS son usados entonces por los herbívoros para reducir los costos fisiológicos de combatir infecciones y parásitos así como para mejorar la capacidad reproductiva, modular su termorregulación, evitar la predación y ayudarlos a estar más alerta (Forbey *et al.*, 2009).

Estell *et al.* (2012) han recopilado efectos benéficos de varios CQS sobre la digestión en los herbívoros, por ejemplo niveles bajos de taninos en la dieta tienen efecto by-pasante en las proteínas y pueden reducir la síntesis de metano, los aceites esenciales actúan sobre la flora ruminal reduciendo la desaminación y la metanogénesis. Rochfort *et al.* (2008) indican que plantas ricas en taninos condensados han servido para evitar la incidencia de timpanismo en el ganado de carne. Por otro lado, Provenza y Villalba (2010) proveen ejemplos de la capacidad de los CQS para modular la respuesta inmune como en el caso de algunos flavonoides que poseen actividad antiinflamatoria, pueden inhibir los linfocitos T y en ciertos casos ser antitumorales, los taninos pueden actuar como bactericidas, probióticos y promover la respuesta inmune contra parásitos, los terpenos tienen actividad bacteriostática y bactericida bastante selectiva tanto a nivel ruminal como intestinal.

Enfocando los efectos de los CQS a nivel de la productividad, Rochfort *et al.* (2008) reportan que la presencia de plantas ricas en taninos condensados en la dieta de ovejas

mejora su producción de lana, eficiencia reproductiva (tasa de ovulación) y producción de leche, así como la presencia de betaina en las pasturas del ganado de carne mejora su tasa de crecimiento gracias a su función termorreguladora durante el estrés por calor.

## **2.6.Respuesta de los Herbívoros a las Defensas de las Plantas**

### 2.6.1. Mecanismos de respuesta

Los herbívoros que se alimentan en pastizales han tenido que desarrollar mecanismos basados en su comportamiento de pastoreo y en su fisiología para lograr nutrirse en un medio lleno de CQS que pueden resultar tóxicos para ellos (Provenza, 2003).

El comportamiento de pastoreo es resultado del aprendizaje afectivo (relación sabor y olor con respuesta pos-ingestiva) y cognitivo (relación de olores y observación), mientras que los mecanismos fisiológicos están basados en la capacidad del organismo para inhibir, metabolizar o tolerar los CQS (Provenza *et al.*, 1992). El aprendizaje les permitirá entonces seleccionar su dieta y desarrollar patrones adecuados de consumo para evitar los efectos nocivos de los CQS, mientras que los mecanismos fisiológicos les permitirán ingerir compuestos potencialmente tóxicos sin que su salud se vea afectada.

#### a. Selectividad durante el pastoreo

Para no sufrir los efectos tóxicos de CQS los animales aprenden a evitar consumir las plantas que los contienen. Dicho conocimiento de qué comer y que no comer puede ser instintivo, aprendido por modelos sociales o a través de la experiencia de ensayo y error (Launchbaugh *et al.*, 2001).

A lo largo de la historia evolutiva los ungulados han desarrollado características anatómicas y fisiológicas propias que les han permitido desarrollar estrategias de alimentación particulares vinculadas también a la tolerancia hacia los CQS. Según la estrategia desarrollada se pueden clasificar en: a) consumidores de grasas, b) consumidores intermedios y c) folívoros o ramoneadores (generalistas o especialistas), siendo los últimos los que demuestran tener los mecanismos más efectivos para incorporar más cantidad o CQS más específicos en su dieta (Iason, 2005). Sumado a este comportamiento innato de pastoreo está la preferencia instintiva del ganado por los

sabores dulces, pero que no siempre cierta pues los mecanismos de retroalimentación entran rápidamente en juego pudiendo favorecer incluso el consumo de sabores amargos si representan una ganancia energética para el estatus nutricional del animal (Launchbaugh *et al.*, 2001).

Los modelos sociales corresponden a individuos que a través de la experiencia han aprendido a seleccionar su dieta, siendo las madres el modelo social por excelencia transmitiendo lo aprendido de otras generaciones a sus crías (Villalba y Provenza, 2009), sin embargo es posible que aprendan de otros adultos o sus congéneres (Launchbaugh *et al.*, 2001).

La experiencia propia a través de la respuesta pos-ingestiva al consumo de un alimento (aprendizaje afectivo) determina la preferencia que el animal tendrá por este, así cuando el alimento es digerido y el animal relaciona con él la sensación de malestar, distensión, mal sabor o poca calidad nutritiva generará una aversión (Kimball y Provenza, 2003).

#### b. Patrones de consumo adaptativos

Existen patrones en el consumo al pastoreo que permiten que la ingestión de CQS no resulte perjudicial. Uno de ellos consiste en consumir una dieta variada donde los CQS interactúan inhibiéndose mutuamente, reduciendo así los impactos negativos. Otro consiste en el consumo cíclico o intermitencia de especies ricas en CQS, es decir se consumen un tiempo y luego se dejan de consumir, para así dar suficiente tiempo al organismo para su detoxificación y regulación de la cantidad a ingerir (Launchbaugh *et al.*, 2001).

Se ha probado en diversas especies que consumiendo dietas con plantas que contienen terpenos y fenoles, taninos y saponinas o terpenos pero de diferentes tipos se logra incluso mayor consumo que si comieran un solo alimento rico en uno de dichos compuestos (Villalba y Provenza, 2009).

#### c. Detoxificación y tolerancia

Ya en el interior del organismo animal existen varios caminos para la disposición de los CQS. Puede sufrir inactivación por proteínas salivares, microorganismos del rumen o por secreciones intestinales, pero también pueden absorberse y ser modificados a nivel

tisular para su eliminación o simplemente no causar perjuicio por tolerancia adquirida de los tejidos (Launchbaugh *et al.*, 2001).

En los ciervos la inactivación de taninos en la cavidad oral ocurre por la presencia de proteínas ricas en prolina (PRP) en su saliva, estas se ligan a los taninos antes que lleguen a otras partes del tracto digestivo; sin embargo estas proteínas de defensa no han sido encontradas en cabras, ovejas o vacas (Makkar, 2003).

La detoxificación de ciertos CQS puede darse en 2 fases (Iason, 2005; Estell, 2010). La fase I implica la actividad de enzimas oxidasas para que las toxinas lipofílicas se vuelvan más solubles y sean eliminadas a través de la orina en forma de ácidos orgánicos. La fase II implica conjugación con otras moléculas como aminoácidos para su eliminación vía orina o bilis.

La tolerancia consiste en la reducción del efecto de una droga conforme se dosifica en sucesivas oportunidades, o la necesidad de aumentar su dosis para que tenga efecto (Provenza *et al.*, 1992). El grado de tolerancia es diferente entre especies e individuos, por ejemplo las ovejas son mucho más resistentes a los efectos de cierto tipo de alcaloides que las vacas, y esto se debe a que la afinidad de los receptores nicotínicos de acetilcolina por la toxina es menor en ellas que en los bovinos (Launchbaugh *et al.*, 2001).

#### 2.6.2. La degradabilidad y digestibilidad como indicadores de la respuesta de herbívoros

Las pruebas *in situ* e *in vitro* han sido empleadas para estudiar los efectos pos-ingestivos de los CQS en herbívoros así como para probar las técnicas para mitigar sus impactos (Silanikove *et al.*, 2001).

La degradabilidad ruminal *in situ* es una técnica muy utilizada en la evaluación de forrajes, que permite conocer el proceso de fermentación y el valor de un alimento que pasa por ese proceso, así como comparar la efectividad de los procesos a los que se ha sometido un alimento (Ørskov *et al.*, 1980). Puede entonces ayudar a conocer los efectos de un CQS sobre la fermentación, del uso de aditivos para inhibirlos o comparar las propiedades de diferentes CQS. Es así como se conoce que el elevado contenido de ácido oxálico no afecta la degradabilidad ruminal de cabras acostumbradas a esta dieta (Estell, 2010), que el uso de propilenglicol es efectivo para mejorar la degradabilidad al aplicarlo en dietas con arbustos taniníferos (Makkar, 2003) y que los taninos de *Lotus*

*pedunculatus* son más efectivos que los de *Lotus corniculatus* para degradar la enzima Rubisco, gracias a sus diferencias en su estructura química (Min *et al.*, 2003).

Las pruebas *in vitro* han sido útiles para observar los efectos de los CQS sobre los microorganismos y para estimar la digestibilidad. La digestibilidad *in vitro* busca el determinar el valor nutritivo de un alimento en un proceso de 2 etapas, una incubación anaerobia con licor ruminal y una segunda etapa de adición de ácido e incubación enzimática, de modo que evita emplear todo el esfuerzo y recursos de ensayos con animales (Tilley y Terry, 1963).

Se ha observado que los terpenos parecen tener un efecto depresor sobre los microorganismos ruminales (Estell, 2010). Además, los microorganismos de diferentes especies (jirafa, impala, oveja, cabra) parecen no diferenciarse mucho en su habilidad para digerir *in vitro* la materia seca de arbustivas taniníferas (Jones *et al.*, 2001).

Por medio de la prueba de digestibilidad *in vitro* se ha podido conocer que los taninos y fenoles pueden reducir entre 5 a 46% la DIVMO de arbustivas cuando se anula su actividad usando PEG (Gemedá y Hassen, 2015).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Caracterización del área experimental**

El experimento se llevó a cabo en un tolar ubicado a 15° 45' 53.28" latitud sur y 70° 39' 26.64" longitud oeste, a 4162 msnm, en la Estación experimental Quimsachata del INIA (Puno) que abarca los distritos de Santa Lucía y Cabanillas pertenecientes a las provincias de Lampa y San Román en la región Puno. La estación comprende un área de 6281 Has, cuyas características ecológicas corresponden a un páramo muy húmedo-Subalpino Subtropical (Pmh-SAS). La temperatura media anual fluctúa entre los 4.5 a 6.0°C, y la precipitación anual es de 500 a 720 mm. La vegetación del área experimental fue evaluada respecto a su cobertura vegetal aérea, basal y biomasa aérea (Anexo N° 1), mostrando la dominancia de *P. lepidophylla* y *Jarawa ichu* en la vegetación.

#### **3.2. Ensayos experimentales**

##### **Ensayo 1: Perfil fitoquímico de *P. lepidophylla***

###### *Objetivo del ensayo*

El objetivo de este ensayo fue identificar los compuestos secundarios presentes en *P. lepidophylla* para caracterizar la fitoquímica de la planta y poder elegir el compuesto más relevante para evaluar cómo varía su concentración por influencia de la intensidad de pastoreo, en el segundo ensayo. Se esperaba encontrar dentro del perfil los compuestos más estudiados en la tribu Asterae, a la que pertenece la planta en estudio, como los diterpenos, flavonoides y coumarinos.

### *Metodología del ensayo*

Este ensayo consistió en la recolección del follaje de *P. lepidophylla* para la caracterización fitoquímica en laboratorio, por lo que fue un ensayo de naturaleza exploratoria.

Los análisis de caracterización o marchas fitoquímicas fueron realizados en el laboratorio del Centro de Control Analítico (CENPROFARMA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) y permitieron determinar la existencia o ausencia de los siguientes compuestos: alcaloides, aminoácidos, azúcares reductores, cardenólidos, triterpenos, esteroides, flavonoides, fenoles, quinonas, lactonas, taninos, saponinas, antocianidinas, catequinas, mucílagos y glicósidos.

Para identificar los CQS se realizaron las marchas fitoquímicas en dos oportunidades, un análisis previo a la ejecución del Ensayo 2 y otros 03 análisis al finalizar dicho ensayo a partir de las muestras de plantas sometidas a intensidades de pastoreo.

Los resultados de la primera marcha fitoquímica permitieron identificar el CQS cuyos cambios en concentración serían evaluados en el Ensayo 2. La elección de dicho compuesto dependió de la facilidad para detectar su presencia en las hojas de la planta de acuerdo con la marcha fitoquímica, que el compuesto reportara en la literatura efectos de defensa anti-herbívoro y que dichos efectos sean sobre la nutrición del animal.

### *Procedimiento de muestreo*

Para la marcha preliminar, antes del cercado del área experimental, se colectaron 30 plantas bajo un sistema de muestreo de transecta lineal al paso a lo largo de 30 metros, cada metro se seleccionó la planta más cercana a la derecha de la transecta. La canopia del arbusto se dividió imaginariamente en cuatro cuadrantes, tomando al azar una rama con hojas de cada cuadrante. Se colectaron las hojas de 4 ramas de cada uno de los 30 arbustos de *P. lepidophylla*, las cuales se mezclaron en una muestra compuesta para realizar la marcha fitoquímica.

Se realizó otra marcha fitoquímica al final del periodo experimental a partir del follaje obtenido de las 75 plantas sometidas al ensayo de intensidad de pastoreo. Debido a la poca muestra obtenida luego de los ensayos, se generaron 3 sub-muestras una

compuesta del follaje cortado con frecuencia de 30 días, la otra compuesta de follaje cortado cada 60 días y la última correspondiente al follaje cortado a 120 días de iniciado el experimento. Estas sub muestras pesaron alrededor de 50 gr.

En ambos casos las hojas se transportaron en bolsas de papel desde el campo experimental y se dejaron secar al aire sobre periódico por un día, en un ambiente ventilado y bajo sombra, para ser inmediatamente remitidas al laboratorio.

### *Análisis de resultados*

El análisis de los resultados de la marcha fitoquímica fue descriptivo, se realizó en base al número de cruces que indican la presencia o ausencia del compuesto (escala: +++, ++, +, -) y comparando esta presencia / ausencia antes y después de la aplicación de las intensidades de pastoreo. El mayor número de cruces indicaba la facilidad visual con la que se podía observar el producto de la reacción (ej. intensidades del color de la reacción), mientras que el signo negativo (-) indicaba que el compuesto no se encontró o que estaba en una cantidad tan pequeña que es imperceptible.

## **Ensayo 2: Concentración de taninos por efecto de la intensidad de pastoreo en *P. lepidophylla***

### *Objetivo*

Este ensayo buscaba determinar si existía una respuesta en la concentración de taninos por efecto de la intensidad de pastoreo simulada, pues postulaba la hipótesis que los taninos se incrementarían como respuesta defensiva al pastoreo conforme aumentaba la intensidad.

### *Metodología del ensayo*

Al igual que en el Ensayo 1, este ensayo fue ejecutado en un tolar de la estación experimental Quimsachata del INIA Puno, cuyas características ambientales y descripción se encuentran en el Anexo N° 2.

Las diferentes intensidades de pastoreo fueron simuladas cortando mecánicamente el follaje de *P. lepidophylla* bajo las combinaciones de dos factores (Tabla N° 2), la

frecuencia de corte, cada 30 y 60 días, y el nivel de uso, al 25 y 50% de remoción del follaje en pie. Paralelamente se trabajó un control al que no se le aplicó ninguna simulación del pastoreo durante el período experimental, sólo se cortó el follaje al 100% de nivel de uso al final del experimento (120 días).

Se analizó la concentración de taninos en muestras (follaje cortado) de las plantas al inicio y al final de la fase experimental para observar el efecto acumulado de la intensidad de pastoreo ejecutado durante el periodo de 120 días.

**Tabla N° 2: Componentes de las intensidades de pastoreo (tratamientos)**

Factores	Tratamientos				
	Simulando Intensidades de Pastoreo*				Sin Simular pastoreo**
	1	2	3	4	Control
<b>Frecuencia de corte</b>	30 días	30 días	60 días	60 días	Ninguna
<b>Nivel de uso</b>	25 %	50 %	25 %	50 %	Ninguno

\*Tratamientos en los que se ejecutaron cortes de follaje durante el periodo experimental.

\*\* Tratamiento donde no se ejecutó corte de follaje. La muestra para análisis se tomó al final del periodo experimental (120 días) y cortando el 100% del follaje disponible del planta).

### *Diseño experimental*

Para determinar si hubo efecto de la intensidad de pastoreo se utilizó un análisis de covariancia con un diseño en bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial. La covariable empleada fue la concentración de taninos (g/Kg MS) al inicio del periodo experimental, mientras que las concentraciones de taninos al finalizar el periodo experimental fueron las variables respuesta sometidas a ajuste. Los tratamientos fueron las intensidades de pastoreo y el control (Tabla N° 2). Los bloques correspondieron a las cinco filas en las que se sortearon los tratamientos en campo. Las filas se distribuyeron perpendiculares a la pendiente es decir, cada una a mayor altura que la otra. El sentido del bloqueo fue para dar mayor uniformidad en la distribución de

los tratamientos y un mismo tratamiento no se acumule en ciertas áreas de la parcela sesgando los resultados.

El modelo aditivo lineal expandido que explica el diseño se presenta a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + f_i + n_j + (f \times n)_{ij} + L_k + \beta(X_{ijk} - \bar{X}) + \varepsilon_{ijk}$$

$i$ : 1, 2  
 $j$ : 1, 2  
 $k$ : 1, 2, 3, 4, 5

donde:

$Y_{ijk}$ : concentración de taninos totales (g/Kg MS), obtenidas bajo la  $i$ -ésima frecuencia de corte,  $j$ -ésimo nivel de uso y  $k$ -ésimo bloque.

$\mu$ : media poblacional.

$f_i$ : efecto de la  $i$ -ésima frecuencia de corte.

$n_j$ : efecto del  $j$ -ésimo nivel de uso.

$(f \times n)_{ij}$ : efecto de la interacción de la  $i$ -ésima frecuencia de corte por el  $j$ -ésimo nivel de uso

$L_k$ : efecto de la  $k$ -ésima fila

$\beta$ : coeficiente de regresión

$X_{ijk}$ : concentración inicial de taninos bajo la  $i$ -ésima frecuencia de corte,  $j$ -ésimo nivel de uso y  $k$ -ésima fila

$\bar{X}$ : promedio de la concentración de taninos inicial

$\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

El análisis de los datos se realizó con el software SAS v.8.0. Para facilitar el análisis y discusión de resultados se buscó aislar los efectos simples de los componentes de la intensidad de pastoreo, es decir la frecuencia de corte y el nivel de uso. Para este fin se empleó la prueba de comparación de contrastes ortogonales, que también permitió analizar la interacción entre ambos factores, así como el efecto del pastoreo (simulado por corte mecánico) independientemente de la intensidad, sobre los cambios en la concentración de taninos. El arreglo de las hipótesis lógicas y coeficientes de los contrastes ortogonales se muestra en la Tabla N° 3.

**Tabla N° 3: Hipótesis lógicas para contrastes ortogonales en el ensayo del efecto de intensidades de pastoreo sobre la concentración de taninos**

<b>Hipótesis lógicas</b>	<b>Comparación</b>	<b>T1</b> 30 d 25%	<b>T2</b> 30 d 50%	<b>T3</b> 60 d 25%	<b>T4</b> 60 d 50%	<b>C</b> 120 d 100%
$\mu_1 + \mu_2 = \mu_3 + \mu_4$	Efecto simple de frecuencias	1	1	-1	-1	0
$\mu_1 + \mu_3 = \mu_2 + \mu_4$	Efecto simple de niveles de uso	1	-1	1	-1	0
$\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 = \mu_c$	Efecto del pastoreo simulado (corte)	1	1	1	1	-4
$\mu_1 + \mu_4 = \mu_2 + \mu_3$	Efecto de Interacciones	1	-1	-1	1	0

#### *Aplicación de tratamientos*

El procedimiento experimental consistió en someter a los 75 arbustos seleccionados a los 4 diferentes niveles de intensidad de pastoreo mencionados, los cuales fueron recreados de manera mecánica con una tijera de poda que simulaba el efecto de la mordida de un animal al pastorear. Los 120 días de duración del experimento transcurrieron durante la época de lluvias y de crecimiento de la planta.

Para seleccionar los arbustos se dividió la parcela experimental en una cuadrícula de cinco filas por cinco columnas, trazando la división con pabilo, obteniéndose 25 celdas de 32m<sup>2</sup>. Se ubicó el centro de la celda y se eligieron las tres plantas más cercanas que cumplieran las características mínimas.

Los tratamientos y el control fueron sorteados dentro de los bloques, ubicándose en la parcela experimental.

La ejecución de los cortes fue realizada por dos personas y tomó de 1 a 2 días dependiendo la cantidad de arbustos que debían cortarse. El primer corte se realizó el mismo día en los 4 tratamientos, posteriormente los cortes fueron mensuales o bimensuales dependiendo del tratamiento, sin embargo cada dos meses coincidían los 4 tratamientos. El último corte correspondió a los 4 tratamientos y además el control.

El porcentaje de nivel de uso (25% ó 50%) se determinó en cada una de las ramas de cada arbusto, se consideró como área de corte desde la base del nacimiento de la primera hoja de la rama hasta la punta de la hoja más alta en el grupo, se midió la longitud entre dichos puntos con una regla o wincha y se determinó el porcentaje a cortar.

#### *Procedimiento de muestreo*

Si bien los arbustos fueron cortados de acuerdo a las frecuencias correspondientes, la recolección de muestras para los análisis de concentración de taninos se hizo sólo en los cortes al inicio y al final del periodo experimental. Al inicio se tomó el follaje cortado de los arbustos bajo los tratamientos 1 al 4, cada cual cortado a la intensidad que le correspondía, los arbustos control no fueron tocados. Al final de los 120 días de ensayo se cortó todo el follaje remanente de los 4 tratamientos y el control, tomando como base la última hoja de cada rama.

El follaje cortado fue recolectado en bolsas de papel, una por cada celda (se mezcló el follaje de los 3 arbustos sometidos al mismo tratamiento), lo que resultó en 5 bolsas de muestra por cada tratamiento. Las muestras fueron ventiladas, extendiéndose en papel periódico y bajo sombra por un día y posteriormente llevadas a secar al laboratorio de CENPROFARMA. Las muestras fueron analizadas para concentración de Taninos Totales bajo el método de espectrofotometría UV-visible (Waterman y Mole, 1994).

### **Ensayo 3: Degradabilidad ruminal y digestibilidad *in vitro* de *P. lepidophylla***

#### *Objetivo del ensayo*

El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de la intensidad de pastoreo en la degradabilidad ruminal y digestibilidad *in vitro* de *P. lepidophylla*, pues la mayor intensidad de pastoreo podría estimular las respuestas defensivas de la planta reduciendo la degradabilidad y digestibilidad.

### *Degradabilidad ruminal*

El ensayo se realizó en la Sala de Poligástricos perteneciente al Departamento Académico de Nutrición de la Facultad de Zootecnia de la UNALM. La universidad está ubicada en la ciudad de Lima, distrito de la Molina, a una altitud de 238 msnm. La temperatura fluctúa entre los 10.8 y 31.7°C, con bajísimo nivel de precipitación (24 mm al año).

La sala es un espacio independiente de las granjas y laboratorios de la facultad, expuesto a la temperatura y humedad ambiental. Cuenta con corrales individuales con muros y piso de cemento y techo de calamina, donde se realizan experimentos de alimentación en rumiantes y se alojan animales fistulados.

Se adaptaron 02 corrales contiguos de 4 x 2.5 metros, para alojar individualmente a llamas. Se colocaron sobre los muros paneles de malla metálica para evitar que los animales puedan salir saltando o estén en contacto entre ellos. Los corrales estuvieron equipados con comederos de madera y baldes de plástico como bebederos.

### *Diseño experimental – Degradabilidad Ruminal*

Los tratamientos empleados fueron los mismos que en el ensayo 2, correspondientes a las 4 intensidades de pastoreo y el control, sólo que la unidad experimental no fue cada grupo de 3 arbustos, sino el pool del follaje de todas las plantas sometidas al mismo tratamiento.

Se desarrollaron curvas de degradabilidad ruminal de la MS por cada tratamiento de intensidad de pastoreo, las cuales grafican la dinámica de la degradabilidad conforme avanzaba el tiempo de incubación de la muestra en el C1 de las llamas.

La ecuación de las curvas de degradabilidad está basada en el modelo de Ørskov y McDonald (1979). Para ajustar la información de porcentaje de MS degradada por tratamiento a la ecuación de curva de degradabilidad se empleó el procedimiento de regresión no lineal del programa IBM® SPSS® Statistics versión 19.

La ecuación de la curva de degradabilidad en función al tiempo de incubación, que ya ha sido utilizada para evaluar dicho parámetro en muestras de arbustivas incubadas en llamas por Genin y Tichit (1997), es la siguiente:

$$p = a + b(1 - e^{-ct})$$

Donde:

- p: Degradabilidad ruminal de la MS (%)
- a: Fracción soluble
- b: Componente insoluble y potencialmente degradable
- c: Tasa constante de degradación de b
- t: Tiempo de incubación

El efecto de las frecuencias de pastoreo y el nivel de uso en la degradabilidad de la MS de las hojas de *P. lepidophylla* fue evaluado sobre la degradabilidad ruminal de la materia seca (%) a las 48 horas de incubación y los coeficientes (a, b y c) de las curvas de degradabilidad de cada uno de los tratamientos.

Las medidas obtenidas fueron analizadas en un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con error de muestreo y los tratamientos fueron comparados usando contrastes ortogonales, distribuidos al igual que en el ensayo de taninos (Tabla N° 3).

Los tratamientos fueron las intensidades de pastoreo. Los bloques, las 2 llamas empleadas y las “sub-muestras” fueron porciones de una sola muestra compuesta por tratamiento, empleándose 3 en cada llama. Al proceder de la misma muestra compuesta, dichas sub-muestras constituyen “pseudoreplicas”.

El modelo aditivo lineal reducido para comparar la degradabilidad ruminal las 48 horas fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + L_j + (T \times L)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

*i*: 1, 2, 3, 4, 5

*j*: 1, 2

*k*: 1, 2, 3

Donde:

- $Y_{ijk}$ : degradabilidad ruminal a las 48 horas (%), obtenidas bajo la *i*-ésima intensidad de pastoreo, *j*-ésima llama y la *k*-ésima medida repetida.
- $\mu$  : media poblacional.
- $T_i$ : efecto de la *i*-ésima intensidad de pastoreo
- $L_j$ : efecto del *j*-ésima llama
- $(T \times L)_{ij}$ : efecto de la interacción de la *i*-ésima intensidad de pastoreo por la *j*-ésima llama
- $L_k$ : efecto de la *k*-ésima fila
- $\epsilon_{ijk}$ : error de muestreo

Los coeficientes de las curvas de degradabilidad (a, b y c) fueron determinados usando el procedimiento de regresión no lineal del programa IBM® SPSS® Statistics versión 19. Para analizarlos se empleó un DBCA, siendo los tratamientos las intensidades de pastoreo y los boques las 2 llamas. Así como en los casos anteriores, se usaron contrastes ortogonales para comparar los niveles de los factores en estudio de acuerdo a la estructura de la Tabla N° 3 y se empleó el software SAS v.8.0 para el análisis.

El modelo aditivo lineal para la evaluación de los coeficientes de las curvas de degradabilidad fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + f_i + n_j + (f \times n)_{ij} + L_k + \epsilon_{ijk}$$

*i*: 1, 2  
*j*: 1, 2  
*k*: 1, 2

donde:

- $Y_{ijk}$ : coeficiente a, b ó c, obtenido bajo la *i*-ésima frecuencia de corte, *j*-ésimo nivel de uso y *k*-ésima llama.
- $\mu$  : media poblacional.
- $f_i$ : efecto de la *i*-ésima frecuencia de corte.
- $n_j$ : efecto del *j*-ésimo nivel de uso.
- $(f \times n)_{ij}$ : efecto de la interacción de la *i*-ésima frecuencia de corte por el *j*-ésimo nivel de uso

$L_k$ : efecto de la k-ésima llama  
 $\epsilon_{ijk}$ : error experimental

El procedimiento experimental contempló las etapas de preparación y cirugía de los animales, así como el ensayo en sí mismo con las bolsas de nylon en las llamas canuladas.

#### *Adaptación, fistulación y canulación de los animales*

Los animales pasaron por un periodo de adaptación a las condiciones de cautiverio y a la nueva dieta por un periodo de un mes (detalles en Anexo N° 4). Una vez adaptados fueron fistulados (proceso en Anexo N° 5) en principio con la técnica de presillas (Manefield *et al.*, 1997), que luego fue corregida con el corte y remoción convencional de la pared ruminal (Cabrera *et al.*, 2000) y finalmente canulados con cánulas de jebe.

#### *Preparación de las muestras*

Las muestras sometidas a este ensayo vienen del follaje colectado para el **Ensayo 2**, es decir sometido a diferentes intensidades de pastoreo por 120 días. Todo el follaje del **ensayo 2 y 3** pasó por el mismo procedimiento de secado y pre-molienda en el laboratorio de CENPROFARMA (secado en estufa a 40°C por 7 días y molienda en molino de cuchillas sin grilla).

Luego de separar las muestras para el **ensayo 2**, se re-agruparon las muestras pertenecientes a un solo tratamiento creando 5 muestras compuestas (de 100 a 500 gr por muestra).

Para ajustarse al tamaño de partícula a ser usado en las bolsas de nylon de la técnica *in sacco*, se hizo una segunda molienda con molino Willey uniformizando las muestras en 2mm de diámetro.

Una vez molidas se prepararon las bolsitas ruminales, en tela de nylon, a un tamaño de 15 x 7 cm (52.5 cm<sup>2</sup> de superficie de contacto), para contener 2 gr de muestra por bolsa, manteniendo una relación de 26.25 cm<sup>2</sup> superficie/gr MS). Estas bolsas fueron cerradas con nylon de pescar y sujetadas a una cadena cromada (cinco bolsas en una cadena, una por cada tratamiento). No se pudo emplear más cantidad muestra pues no se obtuvo suficiente de los arbustos sometidos al tratamiento T2.

### *Procedimiento experimental - Degradabilidad ruminal in sacco*

La degradabilidad ruminal, también llamada degradabilidad *in sacco* o *in situ*, se realizó bajo los principios del método de la bolsa de nylon descrito por Ørskov et al. (1980).

Las muestras de aproximadamente 2 gr. de follaje de *P. lepidophylla* fueron colocadas en bolsas de nylon al interior del C1 de los animales experimentales, por periodos de 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas, con 3 réplicas por animal (detalle en Anexo N° 5).

### *Digestibilidad in vitro*

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca fue realizada por el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal (LBNAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, pero el licor ruminal de llama se obtuvo de las llamas canuladas en la Sala de Poligástricos de la UNALM.

### *Diseño experimental – Digestibilidad in vitro*

Los tratamientos empleados fueron los mismos que en el ensayo 3, correspondientes a las cuatro intensidades de pastoreo y el control. La evaluación de la respuesta a la digestibilidad *in vitro* se realizó bajo un DBCA con error de muestreo y arreglo factorial, donde los tratamientos fueron los mismo que en los ensayos 2 y 3, los bloques las llamas y se emplearon 2 pseudo-réplicas por cada tratamiento y por cada llama, pues las muestras para evaluar un mismo tratamiento provenían de la misma muestra compuesta.

El modelo aditivo lineal empleado fue el mismo que se usó para evaluar la degradabilidad ruminal a las 48 horas, con la diferencia del número de pseudorréplicas.

El análisis de los datos se realizará con el software SAS v.8.0. Las medias de digestibilidad *in vitro* se compararán usando la prueba de contrastes ortogonales, con un nivel de confianza del 95%. El arreglo de las hipótesis lógicas y coeficientes se muestra en la Tabla N° 3.

### *Procedimiento experimental - Digestibilidad in vitro*

Para esta prueba se separaron 20 gr de cada tratamiento, utilizado para 4 corridas, del mismo pool de muestras empleado en el ensayo de degradabilidad *in sacco*, es decir follaje seco y molido de tolas sometidas a intensidades de pastoreo y con 2 mm de tamaño de partícula. Dicha prueba se realizó basándose en la técnica de Tilley y Terry (1963) con las modificaciones hechas por Leyva (2000) al probar proporciones ideales de saliva y licor ruminal de alpaca. Para la colección del licor ruminal se dejó sin alimento a los animales desde la tarde anterior. El licor fue colectado a las 7:30 am con una cuchara larga metálica en un beaker temperado a 38°C. El licor se transportó en un cooler, debidamente asegurado y manteniendo su temperatura. Fue utilizado aproximadamente una hora después de su colección.

### *Análisis complementarios*

Complementariamente se obtuvo información del contenido de proteína, FDN, FDA, lignina y sílice de *P. lepidophylla*, a partir de una muestra por cada tratamiento, antes y después de su aplicación, de modo que se tuvieran otros elementos de discusión como cambios en compuestos primarios o en defensas físicas debido a la intensidad de pastoreo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Ensayo 1: Perfil Fitoquímico de *P. lepidophylla*

La marcha fitoquímica reveló la presencia constante de cuatro grupos de compuestos secundarios: triterpenos, flavonoides, taninos y fenoles (Tabla N° 4). La presencia de los 3 primeros y la ausencia de alcaloides y saponinas es consistente con los hallazgos de Rodrigo et al. (2010) para *P. lepidophylla* boliviana. Además se encontraron aminoácidos, azúcares reductores y quinonas en las muestras preliminares al desarrollo del ensayo 2.

**Tabla N° 4: Marcha fitoquímica**

<b>Prueba</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultado Pre-pastoreo</b>	<b>Resultado Post-pastoreo</b>
Antocianidina	Antocianidina	ND	ND
Aminoácidos	Ninhidrina	D	ND
Cardenólidos	Kedde	ND	ND
Catequinas	Catequinas	ND	ND
Esteroides	Lieberman-Buchard	ND	ND
Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	ND	ND
Azúcares Reductores	Fehling	D	ND
Mucílagos	Mucílagos	ND	ND
Quinonas	Brontrager	D	ND
Lactonas	Baljet	ND	ND
Flavonoides	Shinoda	D	D
Triterpenos	Lieberman-Buchard	D	D
Fenoles	Cloruro Férrico	D	D
Saponinas	Espuma	ND	ND
Glicósidos	Vanillina	ND	ND
Taninos	Cloruro Férrico	D	D

D: Detectable, ND: No Detectable

A pesar que los triterpenos, flavonoides y fenoles han sido estudiados y aislados en diversas plantas de la tribu Asterae (Alvarenga *et al.*, 2001), a la que pertenece *P. lepidophylla*, no es posible generalizar su presencia en todas las especies del grupo debido a la alta variabilidad inter-específica que poseen los CQS (Hartmann, 1996) y que queda demostrada cuando se observan perfiles fitoquímicos de plantas del mismo género que no presentan los mismos CQS, como en el caso de *Baccharis spp.* (Bussmann *et al.* 2009), donde unas presentan taninos y otras no, por ejemplo.

Dentro de los compuestos encontrados, a las quinonas y aminoácidos no proteicos se les atribuye roles de defensa contra insectos. Algunas quinonas actúan como tóxicos o reduciendo la digestibilidad de las proteínas (War *et al.*, 2012), mientras que los aminoácidos no proteicos se incorporan en algunas proteínas modificando su actividad e interfiriendo inclusive en procesos neurológicos (Huang *et al.*, 2011). Los flavonoides son especialmente reconocidos por sus propiedades de protección contra la radiación UV aunque también cumplen roles defensivos contra insectos (Pavarini *et al.*, 2010). Tanto los terpenos como los taninos han sido estudiados por sus propiedades de defensa anti-herbívoro, reportándose actividad sobre mamíferos herbívoros. Sin embargo, se prefirió analizar los taninos para el Ensayo 2 debido a que han sido más estudiados en su rol anti-nutricional sobre mamíferos herbívoros en diversos niveles, desde la cavidad oral, actividad ruminal y absorción intestinal (Barbehenn y Constabel, 2011). En contraste, el estudio de los terpenos se ha centrado más en la actividad anti-microbiana *in vitro* de la flora ruminal dando resultados en ciertos casos contradictorios (Papachristou *et al.*, 2005).

La variación en la concentración de los CQS o su ausencia y presencia en las diferentes etapas de la vida de una planta se deben a múltiples factores y puede observarse desde diferentes perspectivas. Así, influencias externas como el ambiente, disponibilidad de recursos, clima, fenología, el consumo por herbívoros o el ataque de enfermedades pueden modificar de una forma diferente a los CQS y esta actividad puede cambiar en función a la interacción de los factores y a la especie de planta. Por ejemplo la radiación UV incrementa los flavonoides de ciertas planta, las condiciones de sequía pueden estimular la emisión de monoterpenos (Pavarini *et al.*, 2010) e inclusive el ataque de hongos puede evitar la formación de quinonas a partir de otros compuestos fenólicos (Bhattacharya y Shukla, 2000) siendo responsable del intercambio de concentraciones entre estos grupos, pero no puede asegurarse que esto ocurra en todas las plantas ni en todos los ecosistemas.

La bioquímica de los CQS explica en parte su dinámica porque comparten vías metabólicas. Los compuestos fenólicos y nitrogenados comparten las vías del ácido shikímico y el ácido malónico, mientras que los diversos terpenos comparten la vía del ácido mevalónico o MEP, convirtiéndose muchos CQS en precursores de otros o compartiendo las mismas moléculas de origen (Crozier *et al.* 2006; Taiz *et al.*, 2015).

Sin embargo, existe en las plantas un factor interno determinante: la genética, que establece las posibilidades de producción de CQS que una planta puede llegar a tener en función de la expresión de las enzimas adecuadas, ya que la biosíntesis de CQS utiliza enzimas muy específicas (Wink, 2010).

En consecuencia la suma e interacción de factores tanto externos como internos los que interactúan para la determinar la dinámica de los CQS en la planta (Massad *et al.*, 2011) y la bioquímica de la planta que muestra los caminos que uno u otro compuesto puede tomar.

#### **4.2. Ensayo 2: Concentración de Taninos por Efecto de la Intensidad de Pastoreo en *P. lepidophylla***

La concentración de taninos se vio afectada por uno de los componentes de la intensidad de pastoreo. A medida que el corte de los arbustos es más frecuente la concentración de taninos disminuye (cada 60 días: 4.77 g taninos/Kg MS, mientras que cada 30 días: 4.37 g taninos/Kg MS). El pastoreo en sí mismo tiene un efecto de deprimir la concentración de taninos, las plantas sometidas a corte tuvieron una concentración de 4.57 g taninos/Kg MS pero las que no fueron cortadas contenían 4.88 g taninos/Kg MS (Tabla N° 5). Respecto a los otros factores, la cantidad de follaje removido (nivel de utilización) no parece impactar en la concentración de taninos, así como tampoco se evidencia algún efecto de la interacción de los factores en estudio.

Los valores de taninos encontrados están dentro de lo esperado para plantas arbustivas. Los estudios dan rangos diversos en función a las especies vegetales y ecosistemas analizados, pudiéndose encontrar concentraciones de 0.01 a 49.35% taninos condensados/ Kg MS (Furstenburg y van Hoven, 1994), 1.34 a 17.2 % taninos totales/ Kg MS (Gemedá y Hassen, 2015) ó 0.1 a 5.34% Taninos/ Kg MS (Mancilla-Leytón *et al.*, 2014), encajando *P. lepidophylla* en la categoría de concentración baja.

**Tabla N° 5: Efecto de la intensidad de pastoreo en la concentración de taninos**

Factores / contrastes evaluados	Frecuencia de corte		Nivel de Uso		Pastoreo Simulado (Corte de follaje)	
	30 d	60 d	25%	50%	Sin pastoreo simulado	Con pastoreo simulado
Concentración de Taninos (g/Kg MS)	4.37*	4.77*	4.63	4.50	4.88*	4.57*

(\*) Indica la presencia de diferencias significativas entre los promedios comparados para un  $p$ -value < 0.05.

La dinámica en el ascenso o descenso de taninos depende de cada especie en particular, por ejemplo en el Parque Natural Doñana de España, el arbusto *Myrtus communis* disminuyó su concentración de taninos de 0.87% a 0.66% por efecto del pastoreo, mientras que *Pistacia lentiscus* aumentó su concentración de 3.37% a 3.66%, y aun así esta tendencia no es absoluta, pues en ciertas estaciones del año no se observaron diferencias significativas en las concentración de taninos de arbustos pastoreados y no pastoreados dentro de las mismas especies (Mancilla-Leytón *et al.*, 2014). En *P. lepidophylla* los taninos de los arbustos pastoreados alcanzan el 0.46%, mientras que en los no pastoreados llegan al 0.49%, siendo la diferencia pequeña pero significativa al igual que en el caso de *Pistacia lentiscus*.

La disminución de taninos por un pastoreo más frecuente implicaría que estos CQS no constituirían un mecanismo anti-herbívoro, siendo posible que la planta se defienda usando otros compuestos como triterpenos o flavonoides que se encuentran en su perfil fitoquímico, en otras plantas se ha encontrado correlaciones negativas entre terpenoides y taninos pero aún sin la certeza que haya un mecanismo en el que la planta destina sus recursos de defensa “eligiendo” entre uno u otro compuesto (Adams *et al.*, 2013). Otra alternativa es que la planta esté destinando sus recursos para el rebrote en lugar de la defensa, priorizando la tolerancia al pastoreo, qué es otra estrategia que las plantas utilizan para enfrentar el consumo por herbívoros (Gong y Zhang, 2014). En este aspecto, se observó un rebrote lento y escaso en comparación con la cantidad de follaje removido, sin embargo el experimento se realizó en época de lluvias donde la planta dispone de agua suficiente para rebrotar si es que no está limitada en otros nutrientes. Esta explicación encajaría con la GDH que postula que el crecimiento se preferirá sobre

la producción de defensas cuando el nivel de recursos disponibles llega a un punto alto (Herms y Mattson, 1992).

Si bien la diferencia entre frecuencias de corte es clara, esto no quiere decir que los taninos de los arbustos cortados cada 60 días no sufrieran cambios en lo absoluto, pues podría existir cierta temporalidad en la recuperación del nivel original de taninos post-pastoreo. Esta idea se basa en el tiempo que transcurre entre el penúltimo corte de los arbustos y el corte de finalización del experimento, 120 días. Es decir se cuantificaron taninos en muestras de arbustos cortados por última vez hace 30 ó 60 días, encontrándose menos taninos en aquellos cortados más recientemente. Si se considera que el pastoreo no modifica permanentemente el perfil de CQS, cabe entonces la posibilidad que el tratamiento de 60 días también haya descendido en su contenido de taninos, sólo que los arbustos tuvieron suficiente tiempo para recuperar su nivel normal a diferencia del tratamiento de 30 días. Se ha visto que especies arbóreas sometidas a pastoreo con jirafas pueden recuperar su nivel original de taninos en no más de 3 días después del pastoreo, habiendo exhibido aumentos de concentración del 13 al 120 % inmediatamente después del pastoreo (Furstenburg y van Hoven, 1994), es decir existe evidencia de aumentos de concentración de taninos a diferentes escalas pero que retornan a su concentración original. Sin embargo, estos efectos no necesariamente serían tan inmediatos, pues los estudios que observan los efectos del pastoreo en el largo plazo han demostrado tanto aumentos como descensos de concentración de taninos y otros fenoles en rangos de - 17.2 a + 30.8 % (Mancilla-Leytón *et al.*, 2014). En el presente estudio los arbustos con más frecuencia de pastoreo exhiben un 8% menos taninos que los pastoreados cada 60 días, y en general los arbustos sometidos a corte tienen 6% menos taninos que los arbustos control, estos valores se encuentran en el rango de respuestas al pastoreo en el largo plazo.

Podría entonces existir una recuperación en el nivel original de taninos que tardaría más de un mes, dando a entender que la respuesta de los CQS al pastoreo ocurriría en una suerte de mediano plazo alcanzando una recuperación completa de los niveles un par de meses después.

### 4.3. Ensayo 3: Degradabilidad Ruminal y Digestibilidad *in vitro* de *P. lepidophylla*

El nivel de uso tuvo un impacto positivo sobre la degradabilidad ruminal y la DIVMS del follaje de *P. lepidophylla*. Los arbustos que experimentaron un nivel de uso superior 50% vs 25%, mostraron una mayor degradabilidad ruminal a las 48 horas (65.5% vs 63.3%) y una mayor DIVMS (46.27% vs 41.41%), tal como se observa en la Tabla N° 6. Además se evidenció un efecto de la interacción de la frecuencia de corte por el nivel de uso (FCxNU) sobre la degradabilidad ruminal (Figura N° 1), donde se observa que cuando el nivel de uso es bajo (25%), la degradabilidad es menor ante cortes más frecuentes (cada 30 días), pero bajo un nivel de uso es alto la tendencia es opuesta. No hubo efecto significativo de la intensidad de pastoreo sobre los coeficientes de la curva de degradación.

**Tabla N° 6: Efecto de la intensidad de pastoreo en la degradabilidad ruminal a las 48 horas, coeficientes de degradabilidad y digestibilidad *in vitro* de la materia seca**

Factores / contrastes evaluados	Frecuencia de corte		Nivel de Uso		Pastoreo Simulado (Corte de follaje)	
	30 d	60 d	25%	50%	Sin pastoreo simulado	Con pastoreo simulado
<b>Degradabilidad ruminal a las 48 horas (%)</b>	64.14	64.61	63.26*	65.49*	65.62	64.37
<b>a</b>	19.60	19.80	19.35	20.05	19.9	19.70
<b>b</b>	47.00	47.95	46.8	48.15	49.2	47.48
<b>c</b>	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07
<b>DIVMS (%)</b>	43.35	44.33	41.41*	46.27*	40.15*	43.84*

*a: fracción soluble del alimento, b: fracción insoluble pero potencialmente soluble del alimento, c: tasa de degradación constante de la fracción potencialmente soluble*

*(\*) Existen diferencias significativas entre los promedios comparados para un p-value < 0.05.*

La respuesta al pastoreo simulado resulta contradictoria al comparar la degradabilidad ruminal con la digestibilidad *in vitro*. Lo más probable es que se deba al contraste ortogonal utilizado. Los tratamientos de pastoreo simulado al tener respuestas muy diversas enmascaran el efecto de pastorear en sí mismo (el acto de quitarle follaje a la planta), como hay intensidades de pastoreo que reducen o incrementan la degradabilidad al promediarse esta se acerca al Control, pero eso no quiere decir que el pastoreo no tenga efecto en la degradabilidad en lo absoluto sólo que dependerá de la intensidad para notar la diferencia.

Los impactos de la intensidad de pastoreo sobre degradabilidad y DIVMS podrían deberse a la existencia y dinámica de las defensas químicas de *P. lepidophylla*, pues las arbustivas en general son plantas bien defendidas (Papachristou *et al.*, 2005) y armadas de CQS con propiedades documentadas en diversas especies para modificar los parámetros mencionados (Estell, 2010). Sin embargo, estos impactos no parecen estar relacionados a las propiedades defensivas ni a los efectos benéficos de los taninos (pueden actuar como by-pasantes de proteínas) debido a que estos son afectados por la frecuencia de pastoreo, mientras que la degradabilidad y DIVMS es afectada por el nivel de uso, dificultando establecer una relación directa entre ellos y la degradación y digestión en el animal.

No obstante, hay que considerar que se han evaluado taninos totales y no se han separado los taninos hidrolizables de los condensados, los cuales muestran efectos marcadamente diferentes en su actividad y disposición en el organismo de los animales (Acamovic y Brooker, 2005; Estell, 2010), lo que podría ser motivo de estudios más profundos. Existe entonces la posibilidad de que sean otros los CQS de *P. lepidophylla* que podrían exhibir actividad defensiva como los triterpenos, flavonoides y fenoles, cuya concentración no fue medida pero podría haberse modificado de manera diferente a la de los taninos por efecto de la intensidad de pastoreo, pues la dinámica de cada CQS responde de forma diferente a un mismo estímulo, en este caso el corte o pastoreo y así lo demuestran Estell *et al.* (1996), Scogings *et al.* (2013) y Mancilla-Leytón *et al.* (2014), al analizar en simultáneo diversos CQS.

Es posible que el nivel de uso superior haya sobrepasado la capacidad defensiva de la planta respecto a compuestos que interfieren en la digestión, mostrando la flexibilidad de las defensas de *P. lepidophylla*, es decir que estas dejan de producirse por la necesidad de orientar los recursos al crecimiento y rebrote, lo que se explica dentro de la hipótesis de Carbono – Nutriente (Stamp, 2003). La planta entonces estaría dirigiendo

recursos a otras estrategias para su sobrevivencia como la recuperación del tejido perdido, que al ser tejido nuevo contendría mayor concentración de nutrientes, mejorando la digestibilidad, o podría conducir sus recursos hacia compuestos defensivos con diferente actividad, posiblemente más efectiva que la inhibir o modificar proteínas, por ejemplo hacia la producción de terpenoides que podrían causar aversiones por su olor y sabor. Complementariamente, el 25% de utilización de los arbustos podría ser el estímulo propicio para desencadenar la producción de compuestos poco digestibles o de defensas que estarían deprimiendo la capacidad de degradación de los microorganismos del C1, ligándose a enzimas digestivas o incluso alterando sus procesos biológicos, pues según los fundamentos de la hipótesis de disponibilidad de recursos el costo de defenderse a ese nivel de ataque sería menor al costo de recuperarse del daño causado por los herbívoros (Kimball y Provenza, 2003).

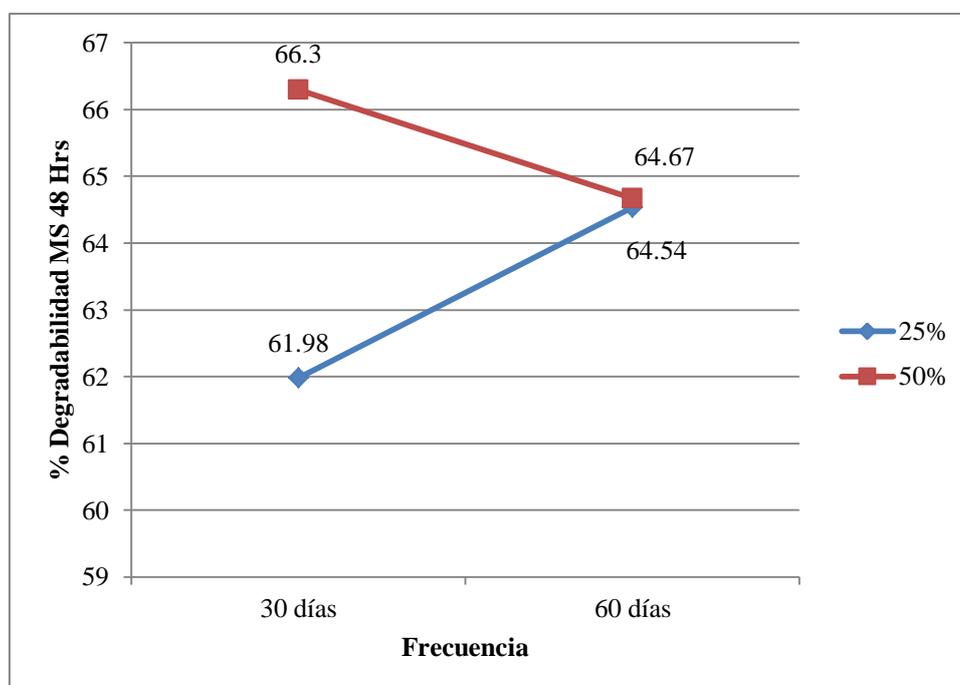
Para poder interpretar los resultados de la interacción FC x NU hay que tener observadas las tendencias desde la perspectiva de cada factor. Cuando el nivel de uso es bajo (25%), la degradabilidad aumenta a medida que la frecuencia disminuye; pero si el nivel de uso es alto (50%) la degradabilidad disminuye a medida que la frecuencia se reduce. Entonces si la frecuencia de corte es alta (cada 30 días) la degradabilidad aumentará a medida que se incremente el nivel de uso y si la frecuencia de corte es baja (cada 60 días) la degradabilidad se mantiene casi constante en ambos niveles de uso.

Estos hallazgos revelarían que bajo un régimen de pastoreo frecuente con poca remoción de follaje (25 %) *P. lepidophylla* desencadena mecanismos defensivos que limitan la degradabilidad, pero cuando la cantidad de follaje removido es mayor (50 %) estos mecanismos no se producen o son sobrepasados y ocurren otros que mejoran la degradabilidad. En cambio cuando los pastoreos son menos frecuentes parece no activarse el mecanismo defensivo o ser muy leve, pero no es influenciado por la cantidad de forraje que se corte. Esto demostraría que la dinámica de la defensa es sensible a los estímulos y no responde simplemente al daño, sino que depende de las características de dicho daño, como qué tan frecuente es, qué tan prolongado es o cuál es su magnitud, como se ha observado en respuestas altamente variables de la dinámica de CQS con diferentes niveles de uso o carga animal (Estell *et al.*, 1996; Barroso *et al.*, 2003; Scogings *et al.*, 2013).

El hecho que la interacción FC x UN no haya afectado la DIVMS pero sí la degradabilidad ruminal a las 48 horas podría evidenciar la existencia de factores *in vivo* que marcan la diferencia. Uno de ellos sería la presencia de saliva de llama, que no

logra replicarse *in vitro* por el tipo de proteínas que esta podría contener y que en herbívoros silvestres interactúa con los CQS (Makkar, 2003). Otro factor a considerar es la exposición de la muestra al ataque de microorganismos del C1, pues en el ensayo de degradabilidad *in situ* se tiene 2 g expuestos a todo el volumen del compartimiento, mientras que *in vitro* es casi la misma cantidad de muestra a un volumen mucho más reducido, es decir el ataque microbiano es más abundante siendo más probable que sobrepase los posibles mecanismos antimicrobianos o de inhibición de muestras tan pequeñas y por ello sí haya un resultado significativo en la degradabilidad en el C1.

**Figura N° 1: Efecto de la interacción de la frecuencia de corte por el nivel de uso sobre la degradabilidad ruminal a las 48 horas (Prueba DLS,  $p < 0.05$ )**



La similitud encontrada en los coeficientes de las curvas de degradabilidad ruminal, obtenidas para cada tratamiento y con cada llama (Tabla N° 6), indicaría que la dinámica de la degradación (fracción soluble, potencialmente soluble y tasa de degradación) es muy parecida bajo cualquier intensidad de pastoreo empleada, sin embargo las ligeras diferencias en la degradación de los tratamientos sí se evidencian en el nivel de degradabilidad a las 48 horas y que es consistente con la DIVMS.

Es necesario considerar en el análisis que puede haber una influencia de otro tipo de defensas sobre la degradabilidad y digestibilidad, como las defensas físicas entre ellas la

lignina y el sílice, así como los compuestos primarios que pueden modificarse por la intensidad de pastoreo. Se realizó un análisis complementario (Anexo N° 13) pero sin rigurosidad estadística de la proteína, componentes de fibra, sílice y lignina de *P. lepidophylla* y se observaron diferencias notorias en la calidad de la fibra así como la lignina bajo las diferentes intensidades de pastoreo, pudiendo constituir otro elemento de explicación de las diferencias encontradas.

Finalmente, estas tendencias revelan que la intensidad de pastoreo está provocando cambios en la dinámica en la composición química de las plantas y que en definitiva afecta a los CQS (observado a través de los taninos) así como la degradabilidad ruminal y la DIVMS, dejando entrever la posibilidad de efectos defensivos químicos o incluso físicos.

Si bien la existencia de la actividad defensiva de *P. lepidophylla* estaba sugerida por los altos niveles de consumos por llamas pero bajos por otras especies animales durante la época seca (Flores, 1993) así como su naturaleza de planta arbustiva desarrollada en ecosistemas pobres en recursos, es posible que sean otros los mecanismos de defensa muy aparte de aquellos que impactan en el proceso digestivo como es el caso de los mecanismos de aversión a texturas o aromas y que pueden ser causados por sustancias resinosas, que están compuestas de flavonoides y terpenos (Johnson y Brain, 1985) presentes en la marcha fitoquímica, o ciertos terpenos y aceites esenciales que por el olor intenso pueden disuadir a los herbívoros de consumir ciertas plantas (Villalba y Provenza, 2009) y cuya actividad defensiva se vería reflejada en pruebas de aceptación y preferencia.

Los niveles de uso altos (50%) estarían favoreciendo la digestibilidad de los arbustos para las llamas aunque resulte contradictorio al pensamiento tradicional que una planta bien defendida aumentaría sus defensas ante un ataque más intenso por los herbívoros.

Para que esta información sea práctica para el manejo de animales al pastoreo es necesario evaluar los impactos en la salud, producción y calidad de producto animal, pues aún existe la posibilidad que otros CQS ejerzan su actividad limitando la utilización de los nutrientes o causando toxicidad.

## V. CONCLUSIONES

1. *P. lepidophylla* contiene flavonoides, triterpenos, fenoles, taninos, quinonas, azúcares reductores y aminoácidos dentro de su perfil de compuestos secundarios.
2. El pastoreo frecuente, cada 30 días, redujo la concentración de taninos totales en hojas de *P. lepidophylla*, por lo que no constituirían un mecanismo de defensa anti-herbívoro para la planta en el mediano plazo.
3. La concentración de taninos totales en las hojas de *P. lepidophylla* no mostró una variación significativa entre los niveles de utilización del 25 y del 50 % del follaje disponible.
4. Un 50% de nivel de utilización tuvo un efecto positivo sobre la degradabilidad ruminal en llamas a las 48 horas de incubación y la DIVMS de *P. lepidophylla* reduciendo la capacidad de defensa anti-herbívoro de la planta.
5. La frecuencia de pastoreo, a diferencia del nivel de uso, no afectó la degradabilidad ruminal en llamas a las 48 horas de incubación ni la DIVMS de *P. lepidophylla*.
6. La interacción del nivel de uso y frecuencia de corte originó respuestas de la degradabilidad ruminal a las 48 horas que son diferentes a sus efectos aislados demostrando que la intensidad del daño desencadena respuestas defensivas particulares en las plantas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Realizar experimentos analizando la concentración de los principales grupos de CQS así como los nutrientes primarios de una planta y establecer en qué medida los CQS estarían afectando la digestibilidad u otro parámetro.
2. Profundizar en el análisis de la diversidad de daños ocasionados por el pastoreo sobre las plantas para determinar los umbrales en los que los estímulos sobrepasan la capacidad defensiva de los CQS.
3. Aislar los CQS y ofrecerlos en cantidades definidas dentro de las dietas de los animales para poder observar el efecto aislado de un CQS sobre la degradabilidad, digestibilidad, consumo y producción de una animal.
4. Diseñar ensayos para determinar la naturaleza y tipo de rol de los diferentes mecanismos, como tolerancia, evasión o defensa, utilizados por las plantas para enfrentar el pastoreo.
5. Establecer las diferencias en el comportamiento de diferentes especies animales (ovino, alpaca, llama) para lidiar con los CQS y contribuir así al mejor manejo y aprovechamiento de las plantas arbustivas.
6. Evaluar cómo varían las concentraciones de los CQS bajo diferentes escenarios de estrés y otros factores que pudieran modificar el contenido de dichos compuestos en la planta.
7. Diseñar experimentos críticos para establecer otros mecanismos de respuesta química de las plantas a los efectos del manejo del pastoreo, configurando escenarios en los que son dañadas bajo diferentes frecuencias, niveles y formas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acamovic, T., Brooker, J. D. 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *The Proceedings of the Nutrition Society* 64 (3): 403-412.
- Adams, R. P., Muir, J. P., Taylor, C. A., Whitney, T.R. 2013. Differences in chemical composition between browsed and non-browsed *Juniperus ashei* Buch. trees. *Biochemical Systematics and Ecology* 46: 73-78.
- Agostini-Costa, T. da S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., Gimenes, M. A. 2012. Secondary Metabolites. *Chromatography and Its Applications*. s.l., InTech, p.210.
- Agrawal, A. A., Weber, M. G. 2015. On the study of plant defence and herbivory using comparative approaches: How important are secondary plant compounds. *Ecology Letters* 18 (10): 985-991.
- Akula, R., Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6 (11): 1720-1731.
- Alvarenga, S. A. V., Ferreira, M. J. P., Emerenciano, V. P., Cabrol-Bass, D. 2001. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: Characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56: 27-37.
- Alzérreca, H., Calle, P., Laura, J. 2002. Manual de manejo y uso sostenible de la tola y tolares. La Paz, Bolivia, PNUD, ALT, 53.
- Arnillas, C. A., Tovar, C., Cuesta, C. F., Buytaert, W. 2010. Potenciales impactos del cambio climático sobre la biodiversidad en los Andes Tropicales. Serie Panorama Andino sobre Cambio climático. Lima - Quito, CONDESAN, SGCAN.
- Báez, S., Cuesta, F., Cáceres, Y., Arnillas, C., Vásquez, R. 2011. Síntesis del conocimiento de los efectos del Cambio Climático en la biodiversidad de los Andes Tropicales. Serie Panorama Andino sobre Cambio Climático. Lima - Quito, CONDESAN, SGCAN, p.54.
- Barbehenn, R. V., Constabel, C. P. 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72 (13): 1551-1565.
- Barroso, F. G., Martínez, T.F., Paz, T., Alados, C. L., Escós, J. 2003. Relationship of

- Periploca laevigata* (Asclepidaceae) tannins to livestock herbivory. *Journal of Arid Environments* 53 (1): 125-135.
- Barton, K. E., Koricheva, J. 2010. The Ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist* 175(4): 481-493.
- Bhattacharya, A., Shukla, P. 2000. Changes in activity of some phenol related enzyme in fielepa leaves infected with powdery mildew under rainfed and irrigated condition. *Indian Journal of Agricultural Research* 34 (3): 147-151.
- Brandt, J. S., Haynes, M. A., Kuemmerle, T., Waller, D. M., Radeloff, V. C. 2013. Regime shift on the roof of the world: Alpine meadows converting to shrublands in the southern Himalayas. *Biological Conservation* 158: 116-127.
- Bryant, J. P., Provenza, F. D., Pastor, J., Reichardt, P. B., Clausen, T. P., Du Toit, J. T. 1991. Interactions between woody plant and browsing mammals mediated by secondary metabolites. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 431-446.
- Bussmann, R. W., Glenn, A., Meyer, K., Rothrock, A., Townesmith, A., Sharon, D., Castro, M., Cardenas, R., Regalado, S., Del Toro, R., Chait, G., Malca, G., Perez, F. 2009. Phyto-Chemical Analysis of Peruvian Medicinal Plants. *Arnaldoa* 16(1): 105-110.
- Cabrera, R., López, A., Morales, S., Salazar, H., Fuentes. A. M. 2000. Fistulación y canulación permanente del compartimento 1 (Rumen) en Llamas (*Lama glama*). *Archivos de medicina veterinaria* 31 (1): 131-138.
- Catorci, A., Tardella, F. M., Velasquez, J. L., Cesaretti, S., Malatesta, L., Zeballos, H. 2014. How environment and grazing influence floristic composition of dry Puna in the southern Peruvian Andes. *Phytocoenologia* 44 (1-2): 103-119.
- Coley, P. D., Bryant, J. P., Chapin, F. S. 1985. Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science* 230 (4728): 895-899.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. 2006. Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet
- Estell, R. E. 2010. Coping with shrub secondary metabolites by ruminants. *Small Ruminant Research* 94: 1-9.
- Estell, R. E., Fredrickson, E. L., Anderson, D. M., Havstad, K. M., Remmenga, M. D. 1996. Tarbush leaf surface terpene profile in relation to mamalian herbivory. In *Proceedings: Shrubland ecosystem dynamics in a change environment*. Las Cruces, NM., p.237-241.
- Estell, R. E., Fredrickson, E. L., James, D. K. 2016. Effect of light intensity and

wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua*. *Biochemical Systematics and Ecology* 65: 108-114.

Estell, R. E., Havstad, K. M., Cibils, A. F., Fredrickson, E. L., Anderson, D. M., Schrader, T. S., James, D. K. 2012. Increasing Shrub Use by Livestock in a World with Less Grass. *Rangeland Ecology & Management* 65 (6): 553-562.

Fenny, P. P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Recent Advances in Phytochemistry* 10: 1-40.

Flores, E. 1992. Manejo y Evaluación de Pastizales. Folleto divulgativo. Lima, Proyecto TTA – INIAA, p.27.

Flores, E. 1993. Tambos alpaqueros y pastizales I: Manejo y conservación de praderas naturales. Proyecto especial Tambos Alpaqueros

Flores, E. 2013. Pastores de Puna, Cambio climático y Seguridad Alimentaria. En conferencia: Pastores de Puna: Vulnerabilidad y Adaptación al Cambio Climático. Lima, Laboratorio de Ecología y Utilización de Pastizales – UNALM.

Flores, E., Oscanoa, L. 1992. Avances en la Ecología de la Nutrición de ovinos, alpacas y llamas en el Ecosistema de Puna Seca. Programa de Ovinos y Camélidos. División de Pastos naturales. Boletín Técnico no.3.

Forbey, J. S., Harvey, A. L., Huffman, M. A., Provenza, F. D., Sullivan, R., Tasdemir, D. 2009. Exploitation of secondary metabolites by animals: A response to homeostatic challenges. *Integrative and Comparative Biology* 49 (3): 314-328.

Furstenburg, D., van Hoven, W. 1994. Condensed tannin as anti-defoliate agent against browsing by giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in the Kruger National Park. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* 107(2): 425-431.

Futuyma, D. J. 2000. Some current approaches to the evolution of plant – herbivore interactions. *Plant Species Biology* 15: 1-9.

Gemeda, B. S., Hassen, A. 2015. Effect of tannin and species variation on in vitro digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28 (2): 188-199.

Genin, D., Alzérreca, H. 2006. Campos nativos de pastoreo y producción animal en la puna semiárida y árida andina. *Sécheresse* 17 (1-2): 265-274.

Genin, D., Tichit, M. 1997. Degradability of Andean range forages in llamas and sheep. *Journal of Range Management* 50 (4): 381-385.

Genin, D., Villca, Z., Abasto, P. 1994. Diet selection and utilization by llama and sheep in high altitude-arid rangeland of Bolivia. *Rangeland Ecology & Management* 47: 245-

248.

Gong, B., Zhang, G. 2014. Interactions between plants and herbivores: A review of plant defense. *Acta Ecologica Sinica* 34(6): 325-336.

Hanley, M. E., Lamont, B.B., Fairbanks, M. M., Rafferty, C. M. 2007. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8 (4): 157-178.

Hartmann, T. 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 80(1): 177-188.

Hay, L., Brown, J. M. M. 1992. Plant chemical defence: Plant response to physical damage. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative* 101 (3): 537-539.

Herns, D. A., Mattson, W. J. 1992. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* 67 (3): 283.

Huang, T., Jander, G., De Vos, M. 2011. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry* 72 (13): 1531-1537.

Iason, G. 2005. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives. *Proceedings of the Nutrition Society* 64(1): 123-131.

Johnson, N.D., Brain, S. A. 1985. The response of leaf resin to artificial herbivory in *Eriodictyon californicum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 13 (1): 5-9.

Jones, R. J., Meyer, J. H. F., Bechaz, F. M., Stoltz, M. A., Palmer, B., Van der Maerwe, G. 2001. Comparison of rumen fluid from South African game species and from sheep to digest tanniferous browse. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 453-460.

Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., He, X. 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2: 377-392.

Kimball, B. A., Provenza, F. D. 2003. Chemical Defense and Mammalian Herbivores. USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications Paper 236.

Król, A., Amarowicz, R., Weidner, S. 2015. The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* 189: 97-104.

Laca, E., Shipley, L., Reid, E. 2001. Structural anti-quality characteristics of range and pasture plants. *Journal of Range Management* 54 (4): 413-419.

Lambers, H., Chapin, F. S. I., Pons, T. L. 2008. *Plant Physiological Ecology*. Second

New York, Springer, 604.

Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F. J., Silva, F. C. E., Ferreira, A., Costa, A. R., Antunes, C., Almeida, A. M., Coelho, A.V., Sales-Baptista, E. 2011. The effect of tannins on mediterranean ruminant ingestive behavior: The role of the oral cavity. *Molecules* 16 (4): 2766-2784.

Launchbaugh, K. L., Provenza, F. D., Pfister, J. A. 2001. Herbivore response to anti-quality factors in forages. *Journal of Range Management* 54 (4): 431-440.

Lerdau, M. 2002. Benefits of the Carbon - Nutrient Balance Hypothesis. *OIKOS* 98 (3): 534-536.

Leyva, L. G. 2000. Prueba de Digestibilidad in vitro con diferentes proporciones de saliva artificial y flora microbiana en alpacas. s.l., UNMSM. 33 p.

Lock, O. 2001. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Manual de Fitoterapia. Lima, EsSalud, Organización Panamericana de la Salud, p.41-64.

Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49 (3): 241-256.

Mancilla-Leytón, J. M., Joffre, R., Martín Vicente, A. 2014. Effect of grazing and season on the chemical composition of Mediterranean shrub species in Doñana Natural Park, Spain. *Journal of Arid Environments* 108: 10-18.

Manefield, J., Alhadrami, G., Al-dehneh, A., Manefield, J., Alhadrami, G., First, A. A. 1997. First compartment cannulation of the dromedary camel. *Veterinary Research* 28(2): 191-194.

Massad, T. J., Fincher, R. M., Smilanich, A. M., Dyer, L. 2011. A quantitative evaluation of major plant defense hypotheses, nature versus nurture, and chemistry versus ants. *Arthropod-Plant Interactions* 5 (2): 125-139.

Massey, F. P., Hartley, S. E. 2006. Experimental demonstration of the antiherbivore effects of silica in grasses: impacts on foliage digestibility and vole growth rates. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 273 (1599): 2299-2304.

McLeod, M. N., Smith, B. R. 1989. Eating and ruminating behaviour in cattle given forages differing in fibre content. *Journal of Animal Production* 48: 503-511.

Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., McNabb, W. C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology* 106: 3-19.

Nesom, G. L. 1993. Synopsis of *Parastrephia* (Asteraceae: Astereae). *Phytologia* 75 (5):

347–357.

Ørskov, E. R., Hovell, F. D. D., Mould, F. 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedsuffs. *Trop Anim Prod* 5: 195-213.

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 Cambridge* 92: 499-503.

Paca, F., Palao, A., Canaza, D., Bustinza, H., Vásquez, G., Chambilla, R., Chávez, M. 2003. Manual técnico: Repoblamiento de praderas del altiplano con t'ola en el ámbito peruano del sistema T.D.P.S. eds. PNUD y ALT, Puno.

Papachristou, T. G., Dziba, L. E., Provenza, F. D. 2005. Foraging ecology of goats and sheep on wooded rangelands. *Small Ruminant Research* 59: 141-156.

Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., Lopes, N. P. 2010. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* 157: 30-40.

Provenza, F. D. 2003. Twenty-five years of paradox in plant-herbivore interactions and «sustainable» grazing management. *Rangelands* 25 (6): 4-15.

Provenza, F. D., Pfister, J. A., Cheney, C. D. 1992. Mechanisms of learning in diet selection with reference to phytotoxicosis in herbivores. *Journal of Range Management* 45 (1): 36-45.

Provenza, F. D., Villalba, J. J. 2010. The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. *Small Ruminant Research* 89: 131-139.

Reynel, C. 1988. Plantas para leña en el sur-occidente de Puno. Puno, Ministerio de Agricultura, INTERCOOPERATION, 164.

Rhoades, D. F. 1979. Evolution of Plant Chemical Defense against Herbivores. *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York, Academic Press, p.4-48.

Rhoades, D. F. 1985. Offensive-defensive interactions between herbivores and plants: Their relevance in herbivore population dynamics and ecological theory. *American Naturalist* 125 (2): 205-238.

Rochfort, S., Parker, A. J., Dunshea, F. R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69(2): 299-322.

Rodrigo, G. C., Almanza, G. R., Akesson, B., Duan, R. 2010. Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. *Journal of Medical Plant Research* 4 (21): 2204-2210.

- Rogosic, J., Estell, R. E., Ivankovic, S., Kezic, J., Razov, J. 2008. Potential mechanisms to increase shrub intake and performance of small ruminants in mediterranean shrubby ecosystems. *Small Ruminant Research* 74: 1-15.
- Scogings, P. F., Hjältén, J., Skarpe, C. 2013. Does large herbivore removal affect secondary metabolites, nutrients and shoot length in woody species in semi-arid savannas? *Journal of Arid Environments* 88: 4-8.
- Scogings, P. F., Mopipi, K. 2008. Effects of water, grass and N on responses of *Acacia karroo* seedlings to early wet season simulated browsing: Leaf N, fibre and tannin concentrations. *Journal of Arid Environments* 72 (9): 1666-1674.
- Silanikove, N., Perevolotsky, A., Provenza, F. D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91: 69-81.
- Soininen, E. M., Bråthen, K. A., Jurdado, J. G. H., Reidinger, S., Hartley, S. E. 2013. More than herbivory: Levels of silica-based defences in grasses vary with plant species, genotype and location. *Oikos* 122 (1): 30-41.
- Stamp, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly review of biology* 78 (1): 23-55.
- Swain, T. 1979. Tannins and Lignins. *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York, Academic Press, p.657-682.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., Murphy, A. 2015. *Plant Physiology and Development*. Sixth Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc., 761.
- Tapia, M. E. 1971. *Pastos Naturales del Altiplano de Perú y Bolivia*. Publicaciones Miscelanea N° 85. Programa de Investigación Zona Andina, IICA. Quito, Ecuador.
- Tilley, J. M. A., Terry, R. A. 1963. A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Journal of the British Grassland Society* 18 (2): 104–111.
- Tiwari, P., Kumar, B., Mandeep, K., Kaur, G., Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1 (1): 98-106.
- Villalba, J. J., Provenza, F. D. 2009. Learning and Dietary Choice in Herbivores. *Rangeland Ecology & Management* 62 (5): 399-406.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H. C. 2012. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant signaling and behavior* 7 (10): 1306-1320.
- Waterman, P. G., Mole, S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

Wink, M. 2010. Biochemistry of plant secondary metabolism. 2nd Editio Singapore, Wiley-Blackwell, v.40, 445.

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo N° 1: Caracterización del área experimental

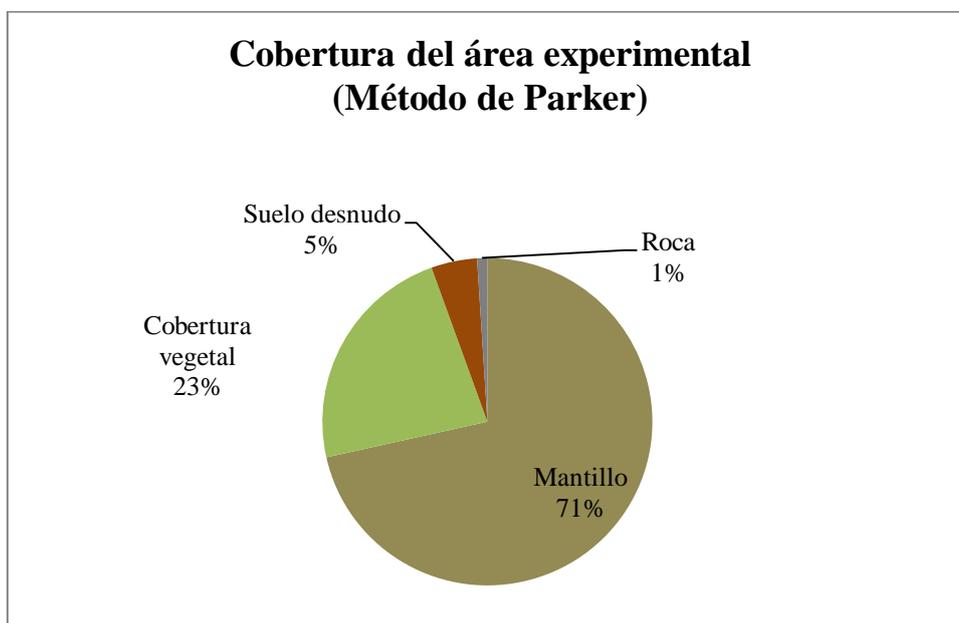
En el área experimental seleccionada dentro del territorio de la estación Quimsachata la composición florística estuvo dominada, en función a la cobertura aérea, principalmente por *Parastrephia lepidophylla* (arbustiva) y en segundo lugar por *Jarawa ichu* var. *pungens* (gramínea). Se encontraron en menor medida, otras especies listadas a continuación.

### Especies vegetales en parcela experimental de Quimsachata (Puno)

Espece	Familia	Grupo Funcional
<i>Azorella sp.</i>	Apiaceae	Pseudo-Gramínea
<i>Bartsia diffusa</i>	Scrophulariaceae	Herbácea
<i>Belloa piptolepis</i>	Asteraceae	Herbácea
<i>Bidens andicola</i>	Asteraceae	Herbácea
<i>Bromus catharticus</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Calamagrostis heterophylla</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Conyza deserticola</i>	Asteraceae	Herbácea
<i>Festuca dolichophylla</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Galium corymbosum</i>	Rubiaceae	Herbácea
<i>Gnaphalium lacteum</i>	Asteraceae	Herbácea
<i>Jarawa ichu</i> var. <i>pungens</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Lepechinia meyenii</i>	Lamiaceae	Herbácea
<i>Mulhembergia fastigiata</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Mulhembergia peruviana</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Nasella sp.</i>	Poaceae	Gramínea
<i>Parastrephia lepidophylla</i>	Asteraceae	Arbustiva
<i>Senecio sp.</i>	Asteraceae	Herbácea
<i>Tagetes multiflora</i>	Asteraceae	Herbácea

La evaluación de pastizal preliminar permitió caracterizar el pastizal respecto a la biomasa aérea, cobertura basal y cobertura aérea. La cobertura vegetal, por el método de Parker, del área de tolar experimental no es muy amplia (23%) al compararse con la gran cantidad de mantillo encontrada (71.5%). Bajo el método de la transecta lineal se encontró una cobertura aérea de 73.6%, considerándose que incluye el aporte de especies de todos los estratos, y una cobertura basal del 16.4%. El método permite saber las especies con mayor aporte de la cobertura vegetal, siendo *P. lepidophylla* y *Jarawa*

*ichu* las mayores aportantes a la cobertura aérea relativa (62.6 % y 23.3 % respectivamente) y a la cobertura basal relativa (57.3 % y 29.9 % respectivamente).



La densidad de plantas de *P. lepidophylla* fue de 2.7 arbustos/m<sup>2</sup>, lo cual permitió tener suficientes arbustos para seleccionarlos en la prueba.

El forraje disponible del área experimental fue calculado por el Método del cuadrante, cortando todo el material vegetal aéreo que caía en los 5 cuadrantes de 1 m<sup>2</sup> distribuidos en las 2 transectas de 30 m que cruzaban el área. En el caso de especies arbustivas se muestrearon ramas y se pesó el follaje de cada una, luego se contaban las ramas que caían en los cuadrantes para determinar su aporte al forraje disponible. El área contaba con 2000 Kg/Ha de forraje disponible, correspondiendo el 46.5% a *P. lepidophylla* y el 50.9 % a *J. ichu*.

## Anexo N° 2: Caracterización físico - química del suelo

pH	C.E. dS/m	CaCO <sub>3</sub> %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico (%)			Clase Textural	CIC meq/100g	Cationes cambiabiles (meq/100g)					Suma de cationes	Suma de bases	% Sat. de bases
						Arena	Limo	Arcilla			Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>+3</sup> + H <sup>+</sup>			
7.84	0.24	0.00	2.37	4.6	196	62	30	8	Fr.A.	19.68	19.26	0.63	0.64	0.15	0.00	19.68	19.68	100

*\* Se muestrearon 4 puntos de la parcela experimental a 30 cm de profundidad y se envió una muestra compuesta para el análisis de las características físico - químicas del suelo.*

### **Anexo N° 3: Descripción del Sitio Experimental: Estación Quimsachata del INIA**

El experimento se llevó a cabo en la estación experimental Quimsachata del INIA (Puno), así como el ensayo 1, durante el periodo de Noviembre del 2014 a Marzo del 2015. Se registró una temperatura promedio de 7.7 °C, con mínima de -2.1°C y máxima de 19.9°C. El promedio diario no fue muy diferente entre los meses de estudio variando de 7.5 a 8 °C. La precipitación acumulada durante los 5 meses fue de 464.5 mm. La humedad relativa (HR) varió de 24.2% (mín.) a 83.2% (máx.), durante el periodo experimental, con un promedio de 63.9%. El promedio de la HR mostró una clara diferencia entre los meses de Noviembre y Diciembre comparados con los meses de Enero a Marzo, donde fue marcadamente superior.

El área experimental fue un tolar ubicado en una ladera junto al conjunto de lagunas denominado Lagunillas. Dicha área de 800 m<sup>2</sup> (40 x 20 m) fue cercada con 6 hilos de alambre de púas para evitar el ingreso de ganado durante el período del experimento, pues en la zona pastorean ovejas, llamas y alpacas.

## **Anexo N° 4: Proceso de adaptación y fistulación de llamas**

### *Adaptación y cuidado de los animales*

La prueba se realizó con dos llamas que fueron fistuladas y canuladas exclusivamente para este ensayo. Las llamas fueron traídas el 25 de Abril del 2015 desde la comunidad campesina de Marcapomacocha y pasaron por un periodo de adaptación a la nueva dieta y condiciones de cautividad antes de ser sometidas a la operación.

Se inició su alimentación con panca seca picada (1 – 4 pulg). Diariamente se cambiaba la ración por una nueva y se decidió colocarla fuera del comedero, en el piso, con el fin de que su alimentación sea lo más parecida a la que tenían en campo.

Los 4 primeros días las llamas no probaron el alimento, luego fueron adaptándose progresivamente. A partir del sexto día se introdujo escalonadamente heno de alfalfa picado (2 a 3 pulg). A las dos semanas ya habían aceptado por completo su nueva dieta y se había retirado por completo la panca picada para quedar con heno de alfalfa como dieta basal, la cual se ofreció entera por fines prácticos.

Al inicio la alimentación fue *ad libitum* (las 2 primeras semanas) pero luego se ajustó la dieta a un consumo para mantenimiento que fue de 1.8 Kg de heno de alfalfa por día, distribuida en 2 raciones a las 7.30 am y a la 1.30 pm. El agua se suministró *ad libitum*, y era cambiada diariamente.

La limpieza de la jaula fue diaria, lo que mantuvo la presencia de moscas considerablemente baja.

### *Fistulación de los animales*

Una vez adaptadas, un mes luego de su llegada, se inició el procedimiento de fistulación, primero colocando unas presillas de aluminio a la altura del ijar izquierdo de las llamas, estirando su piel de modo que las presillas cortaran la circulación y la piel se secara; esto debía dejar un hueco donde se colocaría la cánula. Sin embargo, el procedimiento no fue exitoso requiriendo cirugía para abrir correctamente la fistula.

Los animales no comieron el día anterior a la operación y fueron sedados con Xilasina intramuscular. Se rasuró el área de operación y se lavó con esponja y jabón antiséptico. En la piel alrededor de la ubicación de la cánula se aplicó Lidocaína vía subcutánea para reducir el dolor del corte. Se realizó un corte circular a la piel y serosa, retirando una porción equivalente al diámetro de entrada de la cánula. Al encontrar el Compartimiento 1 (C1), equivalente al rumen, se realizó un corte, drenando un poco de licor y se suturó

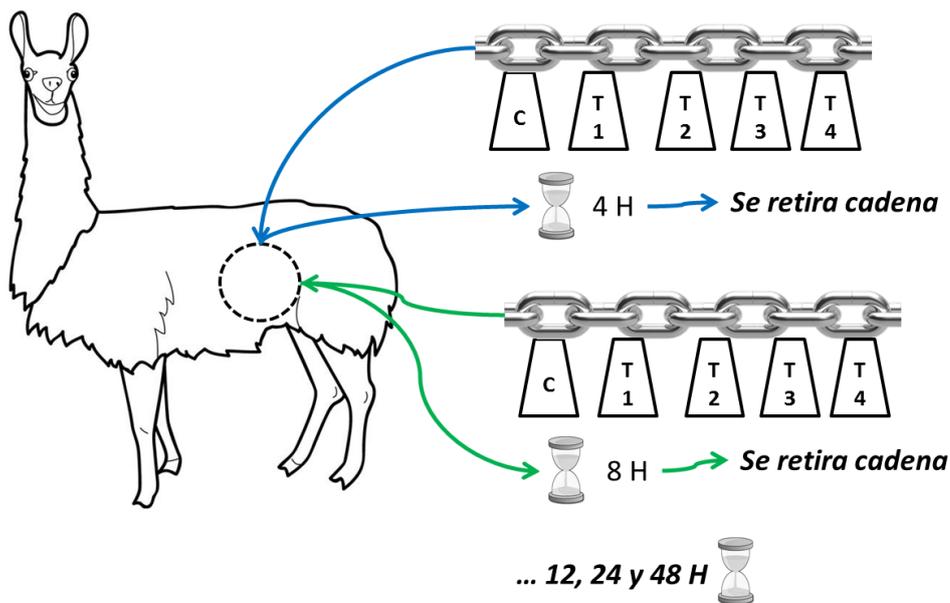
junto al músculo y piel de manera circular para asegurar el orificio. Posteriormente se insertó la cánula de jebe y se aseguró con una arandela acrílica.

Los cuidados posoperatorios consistieron en aplicación por 5 días de Enrofloxacin para prevenir infecciones y Ketoprofeno por 3 días para disminuir la inflamación. Diariamente se limpiaba la cánula, se aplicaba violeta de genciana a la piel bajo la arandela con ayuda de una jeringa y Curamic® Ag Plata en aerosol alrededor de la cánula para evitar la incidencia de moscas. El posoperatorio duró un mes hasta iniciar las pruebas.

## Anexo N° 5: Protocolo de ensayo de degradabilidad ruminal en llamas.

El procedimiento llevado a cabo consistió amarrar cinco bolsitas de 2.0 g, correspondientes a los cinco tratamientos, a una cadena cromada y colocarla dentro del C1 de las llamas fístuladas. Cada cadena de bolsitas permaneció en el C1 un determinado tiempo de incubación, después de finalizado ese tiempo se sacaba la cadena con las bolsitas y se colocaba otra cadena con muestras, que permanecería un tiempo de incubación mayor, de modo que la degradabilidad se evaluó en periodos sucesivos de: 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas.

### Esquema de colocación de muestras para el Ensayo de Degradabilidad Ruminal en llamas



En el caso de la incubación por 0 horas, esta no se dio en el C1 de las llamas, sino que se dejó las bolsitas sumergidas en un balde con agua corriente por espacio de media hora, para la eliminación de los nutrientes solubles y luego se siguió el procedimiento de lavado, tal cual como si hubiesen sido retiradas del C1.

Pasado cada tiempo de incubación se retiraron las bolsitas del C1. Dicho procedimiento consistió en introducir los dedos en la cánula, dentro del compartimiento e ir limpiando el nylon hasta encontrar el inicio de la cadena, así con los dedos de una mano se iba

limpiando la cadena del contenido ruminal y con la otra se jalaba la cadena, el proceso llevaba entre 5 a 20 minutos, dependiendo del que tan al fondo hayan ingresado las bolsitas.

Una vez retiradas y la cánula cerrada las bolsitas fueron introducidas en agua fría para cortar el proceso de fermentación. Se lavaron una por una en agua corriente y se dejaron secar al aire por un día. Posteriormente se secaron en estufa y se pesaron en balanza analítica para determinar el porcentaje degradado de MS por cada tiempo de incubación. Una vez que se introdujeron y retiraron las bolsitas correspondientes a cada tiempo de incubación (de 4 a 48 horas) se consideraba que se terminó una serie de muestras y el animal descansaba por lo menos un par de días.

En total se colocaron 3 series de muestras en cada animal, de modo que cada tratamiento fue evaluado bajo 5 periodos de incubación por 3 veces en dos animales.

## Anexo N° 6: Salidas SAS del análisis de Covarianza para evaluar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la concentración de taninos

concentracion de taninos

Obs	trat	bloque	inicial	final
1	C	1	3.073	4.84
2	C	2	2.729	4.53
3	C	3	2.799	4.92
4	C	4	2.901	4.96
5	C	5	2.649	5.13
6	T1	1	3.435	4.62
7	T1	2	3.127	4.11
8	T1	3	2.609	4.51
9	T1	4	2.283	4.41
10	T1	5	2.647	4.92
11	T2	1	2.917	3.99
12	T2	2	3.102	4.27
13	T2	3	3.515	4.46
14	T2	4	3.478	4.43
15	T2	5	2.466	3.97
16	T3	1	2.385	4.63
17	T3	2	2.275	4.67
18	T3	3	2.636	4.87
19	T3	4	3.414	5.05
20	T3	5	2.919	4.52
21	T4	1	3.553	4.60
22	T4	2	2.410	4.49
23	T4	3	2.435	4.90
24	T4	4	2.427	4.91
25	T4	5	2.563	4.98

concentracion de taninos

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
bloque	5	1 2 3 4 5

Number of observations 25

concentracion de taninos

The GLM Procedure

Dependent Variable: final

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1.85525427	0.20613936	4.80	0.0038
Error	15	0.64480173	0.04298678		
Corrected Total	24	2.50005600			

R-Square    Coeff Var    Root MSE    final Mean  
0.742085    4.480347    0.207333    4.627600

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	1.37009600	0.34252400	7.97	0.0012
bloque	4	0.43113600	0.10778400	2.51	0.0861
inicial	1	0.05402227	0.05402227	1.26	0.2799

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	1.39732514	0.34933128	8.13	0.0011
bloque	4	0.44903318	0.11225830	2.61	0.0775
inicial	1	0.05402227	0.05402227	1.26	0.2799

Parameter	Standard		t Value	Pr >  t
	Estimate	Error		
Intercept	4.515428924 B	0.32531405	13.88	<.0001
trat C	0.079402614 B	0.13240959	0.60	0.5577
trat T1	-0.281247623 B	0.13224789	-2.13	0.0505
trat T2	-0.608420101 B	0.14045526	-4.33	0.0006
trat T3	-0.034505859 B	0.13125697	-0.26	0.7962
trat T4	0.000000000 B	.	.	.
bloque 1	-0.225202963 B	0.14070701	-1.60	0.1303
bloque 2	-0.300771110 B	0.13148015	-2.29	0.0371
bloque 3	0.007753552 B	0.13236652	0.06	0.9541
bloque 4	0.014012963 B	0.13458777	0.10	0.9185
bloque 5	0.000000000 B	.	.	.
inicial	0.134976318	0.12040336	1.12	0.2799

NOTE: The X'X matrix has been found to be singular, and a generalized inverse was used to solve the normal equations. Terms whose estimates are followed by the letter 'B' are not uniquely estimable.

concentracion de taninos

The GLM Procedure  
Least Squares Means

trat	final LSMEAN	Standard	LSMEAN	
		Error	Pr >  t	Number
C	4.87595681	0.09272194	<.0001	1
T1	4.51530657	0.09272926	<.0001	2
T2	4.18813409	0.09808642	<.0001	3
T3	4.76204834	0.09356493	<.0001	4
T4	4.79655419	0.09451735	<.0001	5

Least Squares Means for effect trat  
 Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: final

i/j	1	2	3	4	5
1		0.0149	0.0001	0.4008	0.5577
2	0.0149		0.0287	0.0804	0.0505
3	0.0001	0.0287		0.0009	0.0006
4	0.4008	0.0804	0.0009		0.7962
5	0.5577	0.0505	0.0006	0.7962	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

bloque	final LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr >  t	Number
1	4.50323855	0.09721839	<.0001	1
2	4.42767040	0.09352038	<.0001	2
3	4.73619506	0.09279741	<.0001	3
4	4.74245447	0.09311208	<.0001	4
5	4.72844151	0.09525078	<.0001	5

Least Squares Means for effect bloque  
 Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: final

i/j	1	2	3	4	5
1		0.5907	0.1054	0.0917	0.1303
2	0.5907		0.0330	0.0316	0.0371
3	0.1054	0.0330		0.9627	0.9541
4	0.0917	0.0316	0.9627		0.9185
5	0.1303	0.0371	0.9541	0.9185	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.  
 concentracion de taninos

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
bloque	5	1 2 3 4 5

Number of observations 25

concentracion de taninos

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: final

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1.80123200	0.22515400	5.16	0.0026
Error	16	0.69882400	0.04367650		
Corrected Total	24	2.50005600			

R-Square Coeff Var Root MSE final Mean

0.720477 4.516147 0.208989 4.627600

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	1.37009600	0.34252400	7.84	0.0011
bloque	4	0.43113600	0.10778400	2.47	0.0867

concentracion de taninos

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
bloque	5	1 2 3 4 5

Number of observations 25

concentracion de taninos

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: inicial

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1.06325328	0.13290666	0.72	0.6743
Error	16	2.96522536	0.18532659		
Corrected Total	24	4.02847864			

R-Square Coeff Var Root MSE inicial Mean

0.263934 15.21251 0.430496 2.829880

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	0.52361384	0.13090346	0.71	0.5992
bloque	4	0.53963944	0.13490986	0.73	0.5858

**Anexo N° 7: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la concentración de taninos**

CONCENTRACION DE TANINOS

Obs	trat	bloq	inicial	final
1	C	1	3.073	4.84
2	C	2	2.729	4.53
3	C	3	2.799	4.92
4	C	4	2.901	4.96
5	C	5	2.649	5.13
6	T1	1	3.435	4.62
7	T1	2	3.127	4.11
8	T1	3	2.609	4.51
9	T1	4	2.283	4.41
10	T1	5	2.647	4.92
11	T2	1	2.917	3.99
12	T2	2	3.102	4.27
13	T2	3	3.515	4.46
14	T2	4	3.478	4.43
15	T2	5	2.466	3.97
16	T3	1	2.385	4.63
17	T3	2	2.275	4.67
18	T3	3	2.636	4.87
19	T3	4	3.414	5.05
20	T3	5	2.919	4.52
21	T4	1	3.553	4.60
22	T4	2	2.410	4.49
23	T4	3	2.435	4.90
24	T4	4	2.427	4.91
25	T4	5	2.563	4.98

CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
bloq	5	1 2 3 4 5
trat	5	C T1 T2 T3 T4

Number of observations 25

CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

Dependent Variable: final

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	1.80123200	0.22515400	5.16	0.0026
Error	16	0.69882400	0.04367650		
Corrected Total	24	2.50005600			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	final Mean
0.720477	4.516147	0.208989	4.627600

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloq	4	0.43113600	0.10778400	2.47	0.0867
trat	4	1.37009600	0.34252400	7.84	0.0011

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
bloq	4	0.43113600	0.10778400	2.47	0.0867
trat	4	1.37009600	0.34252400	7.84	0.0011

CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for final

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.043677
Critical Value of t	2.11991
Least Significant Difference	0.2802

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	trat
A	4.8760	5	C
B A	4.7760	5	T4
B A	4.7480	5	T3
B	4.5140	5	T1
C	4.2240	5	T2

## CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for final

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 16  
Error Mean Square 0.043677

Number of Means 2 3 4 5  
Critical Range .2802 .2938 .3023 .3082

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan			
Groupi	Mean	N	trat
A	4.8760	5	C
B A	4.7760	5	T4
B A	4.7480	5	T3
B	4.5140	5	T1
C	4.2240	5	T2

## CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for final

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 16  
Error Mean Square 0.043677  
Critical Value of t 2.11991  
Least Significant Difference 0.2802

Means with the same letter are not significantly different.

t			
Groupi	Mean	N	bloq
A	4.7520	5	4
A	4.7320	5	3
A	4.7040	5	5
B A	4.5360	5	1
B	4.4140	5	2

## CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for final

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 16  
Error Mean Square 0.043677

Number of Means 2 3 4 5  
Critical Range .2802 .2938 .3023 .3082

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan  
Grouping  
Mean N bloq

A	4.7520	5	4
A	4.7320	5	3
B A	4.7040	5	5
B A	4.5360	5	1
B	4.4140	5	2

## CONCENTRACION DE TANINOS

The GLM Procedure

Dependent Variable: final

Contrast	DF	Contrast SS	Mean Square	F Value	Pr > F
freq	1	0.77224500	0.77224500	17.68	0.0007
niveluso	1	0.08580500	0.08580500	1.96	0.1801
corte	1	0.38564100	0.38564100	8.83	0.0090
inter	1	0.12640500	0.12640500	2.89	0.1083

## Anexo N° 8: Salidas SPSS para cálculo de coeficientes de curvas de degradabilidad ruminal

```
SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T1_llama1.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_=a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.
```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	25152,629	5,000	20,000	,010
1.1	4012960,330	18,770	-508,049	,408
1.2	860,273	16,232	62,500	,038
2.0	860,273	16,232	62,500	,038
2.1	1986,430	17,553	31,983	,074
2.2	458,203	19,417	49,965	,050
3.0	458,203	19,417	49,965	,050
3.1	443,598	17,440	42,148	,081
4.0	443,598	17,440	42,148	,081
4.1	306,401	18,059	46,478	,076
5.0	306,401	18,059	46,478	,076
5.1	306,031	17,896	46,441	,078
6.0	306,031	17,896	46,441	,078
6.1	306,013	17,956	46,469	,077
7.0	306,013	17,956	46,469	,077
7.1	306,012	17,939	46,463	,077
8.0	306,012	17,939	46,463	,077
8.1	306,012	17,944	46,465	,077
9.0	306,012	17,944	46,465	,077
9.1	306,012	17,943	46,465	,077
10.0	306,012	17,943	46,465	,077
10.1	306,012	17,943	46,465	,077

Las derivadas se calculan numéricamente.

a. El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.

b. La ejecución se detuvo después de 22 evaluaciones de modelos y 10 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho, SCON = 1.00E-008.

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	17,943	2,944	11,628	24,258
b	46,465	3,706	38,516	54,414
c	,077	,015	,045	,110

**Correlaciones de las estimaciones de los parámetros**

	a	b	c
a	1,000	-,582	-,602
b	-,582	1,000	-,177
c	-,602	-,177	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	36722,512	3	12240,837
Residual	306,012	14	21,858
Total sin corrección	37028,524	17	
Total corregido	3852,878	16	

Variable dependiente: degrad

a.  $R^2 = 1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .921$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T2_llama1.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	27136,965	5,000	20,000	,010
1.1	3499073,199	18,455	-473,342	,393
1.2	1095,024	15,038	62,410	,037
2.0	1095,024	15,038	62,410	,037
2.1	1243,313	17,492	39,741	,069
2.2	768,112	18,154	43,856	,063
3.0	768,112	18,154	43,856	,063
3.1	312,173	17,756	51,266	,070
4.0	312,173	17,756	51,266	,070
4.1	311,280	17,977	51,495	,067
5.0	311,280	17,977	51,495	,067
5.1	311,229	17,884	51,454	,068
6.0	311,229	17,884	51,454	,068
6.1	311,226	17,908	51,470	,068
7.0	311,226	17,908	51,470	,068
7.1	311,226	17,902	51,467	,068
8.0	311,226	17,902	51,467	,068
8.1	311,226	17,903	51,468	,068
9.0	311,226	17,903	51,468	,068
9.1	311,226	17,903	51,468	,068

Las derivadas se calculan numéricamente.

a. El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.

b. La ejecución se detuvo después de 20 evaluaciones de modelos y 9 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho,  $SSCON = 1.00E-008$ .

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	17,903	2,887	11,710	24,096
b	51,468	3,866	43,176	59,759
c	,068	,013	,040	,096

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,475	-,615
b	-,475	1,000	-,289
c	-,615	-,289	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	39136,446	3	13045,482
Residual	311,226	14	22,230
Total sin corrección	39447,672	17	
Total corregido	4609,238	16	

Variable dependiente: degrad

a.  $R^2 = 1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .932$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T3_llama1.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	21871,060	5,000	20,000	,010
1.1	986456,502	17,691	-252,618	,250
1.2	3732,726	11,167	49,671	,029
2.0	3732,726	11,167	49,671	,029
2.1	754,091	17,328	42,565	,054
3.0	754,091	17,328	42,565	,054
3.1	452,388	17,667	52,676	,044
4.0	452,388	17,667	52,676	,044
4.1	442,275	17,433	52,587	,048
5.0	442,275	17,433	52,587	,048
5.1	442,210	17,500	52,814	,047
6.0	442,210	17,500	52,814	,047
6.1	442,209	17,488	52,796	,047
7.0	442,209	17,488	52,796	,047
7.1	442,209	17,490	52,799	,047
8.0	442,209	17,490	52,799	,047
8.1	442,209	17,490	52,799	,047

Las derivadas se calculan numéricamente.

a. El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.

b. La ejecución se detuvo después de 17 evaluaciones de modelos y 8 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho, SCON = 1.00E-008.

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	17,490	3,276	10,463	24,517
b	52,799	6,080	39,759	65,838
c	,047	,014	,016	,078

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,082	-,647
b	-,082	1,000	-,635
c	-,647	-,635	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	32606,713	3	10868,904
Residual	442,209	14	31,586
Total sin corrección	33048,922	17	
Total corregido	4435,831	16	

Variable dependiente: degrad

a. R cuadrado =  $1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .900$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T4_llama1.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	24064,406	5,000	20,000	,010
1.1	1546767,331	20,049	-318,403	,288
1.2	3902,511	11,906	51,171	,030
2.0	3902,511	11,906	51,171	,030
2.1	1481,546	19,477	33,582	,062
3.0	1481,546	19,477	33,582	,062
3.1	457,415	19,766	48,273	,052
4.0	457,415	19,766	48,273	,052
4.1	445,112	19,531	48,080	,057
5.0	445,112	19,531	48,080	,057
5.1	444,981	19,630	48,314	,056
6.0	444,981	19,630	48,314	,056
6.1	444,979	19,612	48,296	,056
7.0	444,979	19,612	48,296	,056
7.1	444,979	19,615	48,300	,056
8.0	444,979	19,615	48,300	,056
8.1	444,979	19,614	48,299	,056

Las derivadas se calculan numéricamente.

- a. El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.
- b. La ejecución se detuvo después de 17 evaluaciones de modelos y 8 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho, SCON = 1.00E-008.

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	19,614	3,364	12,400	26,829
b	48,299	5,127	37,303	59,295
c	,056	,016	,022	,091

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,290	-,633
b	-,290	1,000	-,464
c	-,633	-,464	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	35292,789	3	11764,263
Residual	444,979	14	31,784
Total sin corrección	35737,768	17	
Total corregido	4038,466	16	

Variable dependiente: degrad

a. R cuadrado =  $1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .890$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_C_llama2.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	29418,264	5,000	20,000	,010
1.1	2979358,390	22,096	-439,834	,368
1.2	2399,407	14,444	59,430	,035
2.0	2399,407	14,444	59,430	,035
2.1	1702,666	20,898	34,367	,071
3.0	1702,666	20,898	34,367	,071
3.1	296,953	20,594	48,706	,075
4.0	296,953	20,594	48,706	,075
4.1	296,149	20,637	48,744	,073
5.0	296,149	20,637	48,744	,073
5.1	296,146	20,620	48,741	,073
6.0	296,146	20,620	48,741	,073
6.1	296,146	20,621	48,742	,073
7.0	296,146	20,621	48,742	,073
7.1	296,146	20,621	48,742	,073

Las derivadas se calculan numéricamente.

- El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.
- La ejecución se detuvo después de 15 evaluaciones de modelos y 7 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho, SCON = 1.00E-008.

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	20,621	2,821	14,571	26,671
b	48,742	3,665	40,881	56,602
c	,073	,014	,043	,103

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,532	-,606
b	-,532	1,000	-,231
c	-,606	-,231	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	41884,199	3	13961,400
Residual	296,146	14	21,153
Total sin corrección	42180,345	17	
Total corregido	4248,515	16	

Variable dependiente: degrad

a. R cuadrado =  $1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .930$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T1_llama2.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	25256,822	5,000	20,000	,010
1.1	1721716,916	23,295	-339,671	,294
1.2	4202,326	12,466	51,425	,030
2.0	4202,326	12,466	51,425	,030
2.1	2714,507	22,207	23,018	,069
3.0	2714,507	22,207	23,018	,069
3.1	322,764	21,213	42,398	,080
4.0	322,764	21,213	42,398	,080
4.1	315,457	21,148	42,414	,075
5.0	315,457	21,148	42,414	,075
5.1	315,448	21,167	42,454	,075
6.0	315,448	21,167	42,454	,075
6.1	315,448	21,168	42,454	,075
7.0	315,448	21,168	42,454	,075
7.1	315,448	21,168	42,454	,075

Las derivadas se calculan numéricamente.

- El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.
- La ejecución se detuvo después de 15 evaluaciones de modelos y 7 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho, SCON = 1.00E-008.

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	21,168	2,922	14,899	27,436
b	42,454	3,756	34,398	50,510
c	,075	,017	,039	,111

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,551	-,603
b	-,551	1,000	-,211
c	-,603	-,211	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	36849,622	3	12283,207
Residual	315,448	14	22,532
Total sin corrección	37165,070	17	
Total corregido	3327,938	16	

Variable dependiente: degrad

a. R cuadrado =  $1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .905$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T2_llama2.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	30886,397	5,000	20,000	,010
1.1	3352642,350	23,471	-466,771	,383
1.2	2340,109	15,123	60,663	,036
2.0	2340,109	15,123	60,663	,036
2.1	2117,424	21,945	31,557	,074
3.0	2117,424	21,945	31,557	,074
3.1	247,663	21,218	47,287	,087
4.0	247,663	21,218	47,287	,087
4.1	242,232	21,253	47,410	,082
5.0	242,232	21,253	47,410	,082
5.1	242,219	21,231	47,433	,083
6.0	242,219	21,231	47,433	,083
6.1	242,219	21,232	47,433	,083
7.0	242,219	21,232	47,433	,083
7.1	242,219	21,232	47,433	,083

Las derivadas se calculan numéricamente.

- El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.
- La ejecución se detuvo después de 15 evaluaciones de modelos y 7 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho,  $SSCON = 1.00E-008$ .

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	21,232	2,595	15,665	26,798
b	47,433	3,232	40,501	54,365
c	,083	,014	,053	,112

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,611	-,592
b	-,611	1,000	-,148
c	-,592	-,148	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	43686,179	3	14562,060
Residual	242,219	14	17,301
Total sin corrección	43928,397	17	
Total corregido	4052,588	16	

Variable dependiente: degrad

a.  $R^2 = 1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .940$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T3_llama2.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_=a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	28590,261	5,000	20,000	,010
1.1	3039825,203	23,070	-446,138	,366
1.2	2338,650	14,713	58,826	,035
2.0	2338,650	14,713	58,826	,035
2.1	2431,503	21,577	28,081	,074
2.2	680,838	22,671	40,128	,059
3.0	680,838	22,671	40,128	,059
3.1	226,738	20,849	43,689	,087
4.0	226,738	20,849	43,689	,087
4.1	216,470	20,677	45,404	,084
5.0	216,470	20,677	45,404	,084
5.1	216,464	20,673	45,410	,084
6.0	216,464	20,673	45,410	,084
6.1	216,464	20,673	45,410	,084

Las derivadas se calculan numéricamente.

- El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.
- La ejecución se detuvo después de 14 evaluaciones de modelos y 6 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho,  $SSCON = 1.00E-008$ .

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	20,673	2,461	15,393	25,952
b	45,410	3,045	38,879	51,942
c	,084	,014	,055	,114

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,623	-,589
b	-,623	1,000	-,135
c	-,589	-,135	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	40964,165	3	13654,722
Residual	216,464	14	15,462
Total sin corrección	41180,629	17	
Total corregido	3717,815	16	

Variable dependiente: degrad

a. R cuadrado =  $1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .942$ .

```

SAVE OUTFILE='D:\TESIS MAESTRIA\degrad_T4_llama2.sav'
/COMPRESSED.
* Regresión no lineal.
MODEL PROGRAM a=5 b=20 c=0.01.
COMPUTE PRED_ =a+b*(1-EXP(-c*Tiempo)).
NLR degrad
/OUTFILE='C:\Users\user\AppData\Local\Temp\spss8804\SPSSFNLR.TMP'
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8.

```

### Análisis de regresión no lineal

#### Historial de iteraciones<sup>b</sup>

Número de iteraciones <sup>a</sup>	Suma de cuadrados residual	Parámetro		
		a	b	c
1.0	30382,170	5,000	20,000	,010
1.1	3659293,428	23,990	-488,675	,393
1.2	1992,346	15,742	61,169	,037
2.0	1992,346	15,742	61,169	,037
2.1	2622,258	22,263	27,610	,077
2.2	460,357	23,368	44,646	,056
3.0	460,357	23,368	44,646	,056
3.1	215,673	21,572	42,005	,090
4.0	215,673	21,572	42,005	,090
4.1	141,885	21,294	45,326	,091
5.0	141,885	21,294	45,326	,091
5.1	141,883	21,297	45,328	,091
6.0	141,883	21,297	45,328	,091
6.1	141,883	21,297	45,328	,091

Las derivadas se calculan numéricamente.

- El número de iteraciones mayores se muestra a la izquierda del decimal, mientras que el número de iteraciones menores se encuentra a la derecha del decimal.
- La ejecución se detuvo después de 14 evaluaciones de modelos y 6 evaluaciones de derivadas, ya que la reducción relativa entre sumas residuales sucesivas de cuadrados es, como mucho, SCON = 1.00E-008.

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
a	21,297	2,015	16,975	25,618
b	45,328	2,445	40,084	50,571
c	,091	,012	,066	,116

#### Correlaciones de las estimaciones de los parámetros

	a	b	c
a	1,000	-,663	-,579
b	-,663	1,000	-,093
c	-,579	-,093	1,000

**ANOVA<sup>a</sup>**

Origen	Suma de cuadrados	gl	Medias cuadráticas
Regresión	43179,778	3	14393,259
Residual	141,883	14	10,135
Total sin corrección	43321,661	17	
Total corregido	3655,769	16	

Variable dependiente: degrad

a.  $R^2 = 1 - (\text{Suma de cuadrados residual}) / (\text{Suma corregida de cuadrados}) = .961$ .

**Anexo N° 9: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la degradabilidad ruminal a las 48 horas**

degradabilidad ruminal 48 Horas

Obs	trat	llama	rep	deg
1	C	1	R1	61.79
2	T1	1	R1	57.41
3	T2	1	R1	61.91
4	T3	1	R1	63.49
5	T4	1	R1	62.94
6	C	1	R2	66.77
7	T1	1	R2	62.96
8	T2	1	R2	66.26
9	T3	1	R2	63.65
10	T4	1	R2	63.46
11	C	1	R3	64.23
12	T1	1	R3	62.87
13	T2	1	R3	68.04
14	T3	1	R3	65.06
15	T4	1	R3	64.91
16	C	2	R1	68.22
17	T1	2	R1	60.26
18	T2	2	R1	67.38
19	T3	2	R1	65.97
20	T4	2	R1	64.49
21	C	2	R2	65.41
22	T1	2	R2	64.87
23	T2	2	R2	68.23
24	T3	2	R2	65.93
25	T4	2	R2	67.13
26	C	2	R3	67.27
27	T1	2	R3	63.51
28	T2	2	R3	66.00
29	T3	2	R3	63.11
30	T4	2	R3	65.09

degradabilidad ruminal 48 Horas

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
llama	2	1 2
rep	3	R1 R2 R3

Number of observations 30

degradabilidad ruminal 48 Horas

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: deg

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	91.6757867	10.1861985	2.45	0.0456
Error	20	83.1250000	4.1562500		
Corrected Total	29	174.8007867			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	deg Mean
0.524459	3.154855	2.038688	64.62067

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	64.81775333	16.20443833	3.90	0.0169
llama	1	24.51648000	24.51648000	5.90	0.0247
trat*llama	4	2.34155333	0.58538833	0.14	0.9650

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for trat\*llama as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	64.81775333	16.20443833	27.68	0.0036
llama	1	24.51648000	24.51648000	41.88	0.0029

Degradabilidad ruminal 48 Horas

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for deg

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	0.585388
Critical Value of t	2.77645
Least Significant Difference	1.2265

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	trat
A	66.3033	6	T2
B A	65.6150	6	C
B	64.6700	6	T4
B	64.5350	6	T3
C	61.9800	6	T1

**Anexo N° 10: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre los coeficientes de degradabilidad ruminal**

**Curva degradabilidad coeficiente a**

Obs	trat	llama	a
1	C	1	19.181
2	T1	1	17.943
3	T2	1	17.903
4	T3	1	17.490
5	T4	1	19.614
6	C	2	20.621
7	T1	2	21.168
8	T2	2	21.232
9	T3	2	20.673
10	T4	2	21.297

Curva degradabilidad coeficiente a

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
llama	2	1 2

Number of observations 10

Curva degradabilidad coeficiente a

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: a

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	18.60079160	3.72015832	8.64	0.0288
Error	4	1.72226200	0.43056550		
Corrected Total	9	20.32305360			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	a Mean
0.915256	3.328776	0.656175	19.71220

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	2.06283160	0.51570790	1.20	0.4327
llama	1	16.53796000	16.53796000	38.41	0.0034

Curva degradabilidad coeficiente a

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for a

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 4  
Error Mean Square 0.430565  
Critical Value of t 2.77645  
Least Significant Difference 1.8218

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping

	Mean	N	trat
A	20.4555	2	T4
A	19.9010	2	C
A	19.5675	2	T2
A	19.5555	2	T1
A	19.0815	2	T3

**Curva degradabilidad coeficiente b**

Obs	trat	llama	b
1	C	1	49.657
2	T1	1	46.465
3	T2	1	51.468
4	T3	1	52.799
5	T4	1	48.299
6	C	2	48.742
7	T1	2	42.454
8	T2	2	47.433
9	T3	2	45.410
10	T4	2	45.328

Curva degradabilidad coeficiente b

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
llama	2	1 2

Number of observations 10

Curva degradabilidad coeficiente b

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: b

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	74.36298810	14.87259762	5.42	0.0634
Error	4	10.98526240	2.74631560		
Corrected Total	9	85.34825050			

R-Square    Coeff Var    Root MSE    b Mean

0.871289    3.466549    1.657201    47.80550

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	37.03288400	9.25822100	3.37	0.1331
llama	1	37.33010410	37.33010410	13.59	0.0211

Curva degradabilidad coeficiente b

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for b

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha                    0.05  
Error Degrees of Freedom            4  
Error Mean Square            2.746316  
Critical Value of t            2.77645  
Least Significant Difference    4.6011

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping

	Mean	N	trat
	A	49.451	2 T2
	A	49.200	2 C
	A	49.105	2 T3
B	A	46.814	2 T4
B		44.460	2 T1

**Curva degradabilidad coeficiente c**

Obs	trat	llama	c
1	C	1	0.059
2	T1	1	0.077
3	T2	1	0.068
4	T3	1	0.047
5	T4	1	0.056
6	C	2	0.073
7	T1	2	0.075
8	T2	2	0.083
9	T3	2	0.084
10	T4	2	0.091

Curva degradabilidad coeficiente c

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
llama	2	1 2

Number of observations 10

Curva degradabilidad coeficiente c

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: c

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.00119270	0.00023854	1.80	0.2940
Error	4	0.00052940	0.00013235		
Corrected Total	9	0.00172210			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	c Mean
0.692585	16.13513	0.011504	0.071300

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	0.00021260	0.00005315	0.40	0.8008
llama	1	0.00098010	0.00098010	7.41	0.0529

Curva degradabilidad coeficiente c

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for c

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 4  
Error Mean Square 0.000132  
Critical Value of t 2.77645  
Least Significant Difference 0.0319

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping

	Mean	N	trat
A	0.07600	2	T1
A	0.07550	2	T2
A	0.07350	2	T4
A	0.06600	2	C
A	0.06550	2	T3

**Anexo N° 11: Salidas SAS del análisis de Diseño de Bloques y prueba de contrastes ortogonales para analizar el efecto de la intensidad de pastoreo sobre la DIVMS**

Digestibilidad in vitro de la Materia Seca

Obs	trat	llama	rep	divms
1	C	1	R1	38.64
2	T1	1	R1	39.80
3	T2	1	R1	45.20
4	T3	1	R1	39.00
5	T4	1	R1	50.41
6	C	1	R2	39.97
7	T1	1	R2	41.23
8	T2	1	R2	47.84
9	T3	1	R2	40.47
10	T4	1	R2	43.84
11	C	2	R1	42.98
12	T1	2	R1	40.71
13	T2	2	R1	43.18
14	T3	2	R1	43.53
15	T4	2	R1	45.83
16	C	2	R2	39.02
17	T1	2	R2	41.55
18	T2	2	R2	47.27
19	T3	2	R2	45.00
20	T4	2	R2	46.57

Digestibilidad in vitro de la Materia Seca

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	5	C T1 T2 T3 T4
llama	2	1 2
rep	2	R1 R2

Number of observations 20

Digestibilidad in vitro de la Materia Seca

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: divms

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	168.1564200	18.6840467	4.06	0.0197
Error	10	45.9665000	4.5966500		
Corrected Total	19	214.1229200			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	divms Mean
0.785327	4.974201	2.143980	43.10200

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	141.8516200	35.4629050	7.71	0.0042
llama	1	4.2688800	4.2688800	0.93	0.3579
trat*llama	4	22.0359200	5.5089800	1.20	0.3698

Tests of Hypotheses Using the Anova MS for trat\*llama as an Error Term

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	4	141.8516200	35.4629050	6.44	0.0494
llama	1	4.2688800	4.2688800	0.77	0.4284

Digestibilidad in vitro de la Materia Seca

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for divms

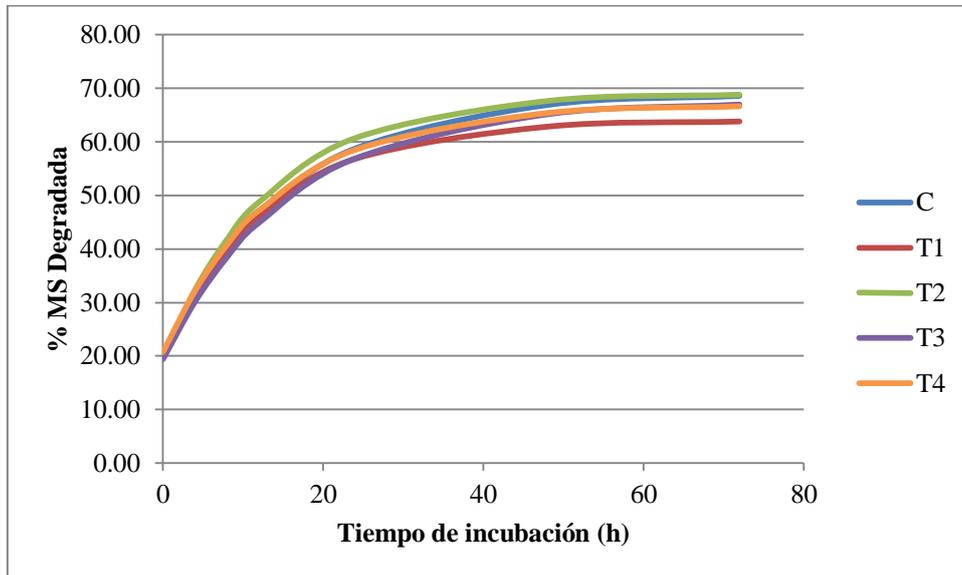
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05  
 Error Degrees of Freedom 4  
 Error Mean Square 5.50898  
 Critical Value of t 2.77645  
 Least Significant Difference 4.608

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	trat
A	46.663	4	T4
B A	45.873	4	T2
B C	42.000	4	T3
C	40.823	4	T1
C	40.153	4	C

**Anexo N° 12: Curvas de degradabilidad ruminal en incubación por 48 horas para *Parastrephia lepidophylla***



**Ecuaciones de las curvas de degradabilidad:**

$$y_C = 20.004 + 49.051 \times (1 - e^{-0.065x})$$

$$y_{T1} = 19.575 + 44.420 \times (1 - e^{-0.076x})$$

$$y_{T2} = 19.707 + 49.344 \times (1 - e^{-0.074x})$$

$$y_{T3} = 19.421 + 48.066 \times (1 - e^{-0.063x})$$

$$y_{T4} = 20.73 + 46.183 \times (1 - e^{-0.071x})$$

### Anexo N° 13: Análisis de nutrientes y defensas físicas

Tratamiento		C	T1	T2	T3	T4			
Frecuencia		120 días	30 días	30 días	60 días	60 días	Promedio	DS	CV (%)
Nivel de uso		100%	25%	50%	25%	50%			
FDN (%)	I	40.5	40.6	39.8	42.8	38.7	40.5	1.5	3.7
	F	44.8	45.4	39.7	44.5	44.9	43.9	2.3	5.4
	Dif	4.3	4.8	-0.1	1.7	6.2			
FDA (%)	I	25.7	25.1	25.8	25.1	26.8	25.7	0.7	2.7
	F	31.9	29.8	37.4	38.7	36.6	34.9	3.8	11.0
	Dif	6.2	4.7	11.6	13.6	9.8			
Proteína (%)	I	7.4	7.1	7.5	7.6	7.4	7.4	0.2	2.5
	F	7.9	9.8	7.4	8.6	10.2	8.8	1.2	13.7
	Dif	0.5	2.7	-0.1	1	2.8			
Sílíce (%)	I	0.34	0.33	0.13	0.42	0.47	0.3	0.1	38.4
	F	0.24	0.27	0.41	0.35	0.23	0.3	0.1	25.8
	Dif	-0.1	-0.06	0.28	-0.07	-0.24			
Lignina (%)	I	10.7	9.1	13.4	10	10.4	10.7	1.6	15.1
	F	26.4	14.7	23.2	23.8	16.6	20.9	5.0	24.0
	Dif	15.7	5.6	9.8	13.8	6.2			

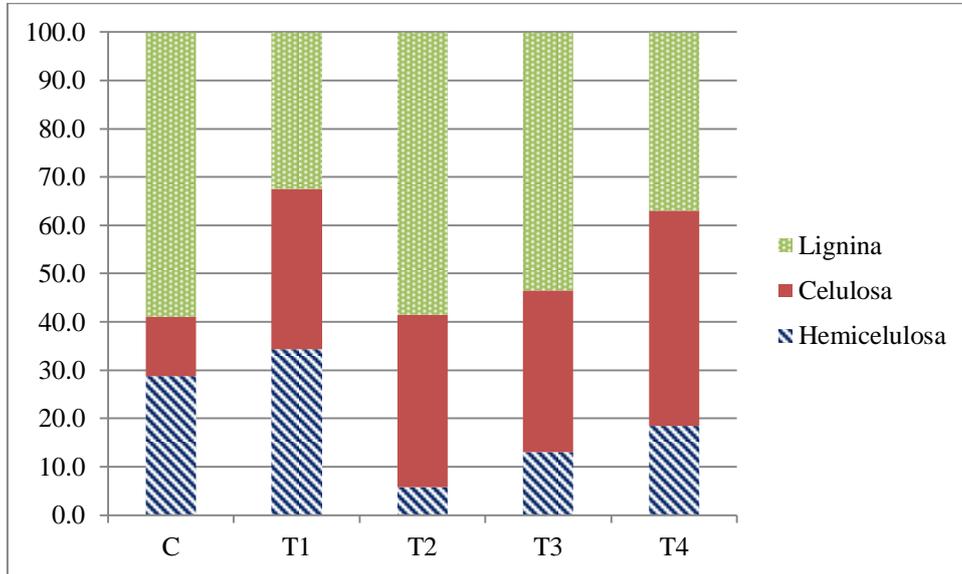
\*Estos valores son referenciales, no tienen significancia estadística pues provienen de una sola muestra por tratamiento sin réplicas.

I: muestras tomadas al inicio del experimento de intensidad de pastoreo (Ensayo 2).

F: muestras tomadas al final del experimento de intensidad de pastoreo (Ensayo 2).

Dif: valor de porcentajes finales – iniciales

**Anexo N° 14: Calidad de Fibra Detergente Neutra en follaje de *P. lepidophylla* sometido a intensidades de pastoreo**



\* No está evaluado estadísticamente.