

Evaluación de criterios de lectura microhistológica para la cuantificación de *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.), Pl Lorentz en mezclas manuales

Evaluation of microhistology estimation criterias for *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.), Pl Lorentz in different mixtures

Alejandra Catán^a, Claudia Alicia Degano^a, Daniel Werenitzky^a

RESUMEN

Sphaeralcea bonariensis (malva) es un componente frecuente en las dietas de caprinos del sistema silvopastoril, del semiárido de la provincia de Santiago del Estero, Argentina. Su cuantificación usando el método microhistológico es dificultosa, debido a la presencia de tricomas desprendidos en los campos microscópicos, sin las epidermis correspondientes. Para estimar correctamente la composición botánica de mezclas de especies forrajeras, se realizaron cuatro mezclas conformadas con *S. bonariensis*, *Tillandsia sp.*, *Prosopis nigra* y *Sorghum halepensis*, y cada mezcla con proporciones diferentes. Estas fueron secadas en la estufa, molidas y preparadas según el método microhistológico, confeccionando 20 laminillas por mezcla. Se leyeron al microscopio las frecuencias de aparición de las especies, con el fin de estimar la composición botánica de cada mezcla; las lecturas se consideraron como positivas de acuerdo a dos criterios: 1) sólo fragmentos epidérmicos de malva, sin considerar pelos sueltos, y 2) fragmentos epidérmicos y número de pelos sueltos sin epidermis. Los valores obtenidos se compararon mediante un índice de similitud y se analizaron estadísticamente. Se condujo como un experimento factorial con diseño completamente aleatorizado (4x2). El análisis de la varianza entre los índices de similitud detectó diferencias significativas entre criterio x mezcla, determinando que el criterio 1 es el propuesto cuando la proporción de malva es baja (10 %), pero cuando la proporción supera el 50 %, el criterio más adecuado es el 2. En elevadas proporciones de malva en la mezcla (80 %), la misma fue subvaluada, independiente del criterio seleccionado para su estimación.

PALABRAS CLAVE: Microhistología, *Sphaeralcea bonariensis*, Criterio lectura, Índice de similitud.

ABSTRACT

Sphaeralcea bonariensis (mallow) is a frequent component in goat diets in the semiarid silvopastoral systems of Santiago del Estero Province, Argentina. Quantification of mallow using the microhistological technique is difficult because trichomes often appear alone in the microscopic field of vision, detached from the epidermis. In an effort to better estimate the botanical composition of forage species in ruminant diets, four mixtures were prepared with different proportions of *S. bonariensis*, *Tillandsia sp.*, *Prosopis nigra* and *Sorghum halepensis*. After collection, the botanical material was oven-dried, milled and prepared following the microhistological method, with 20 slides per mixture. Appearance frequency of species was determined microscopically to estimate the botanical composition of the mixtures. Readings were considered positive according to one of two criteria: 1) epidermis fragments only; and 2) epidermis fragments, or three or more detached hairs. A similarity index was used to compare the resulting values. The similarity index results were statistically analyzed (ANOVA) as a factorial experiment with a totally randomized design (4x2). The Anova between similarity index values showed significant differences between criterion x mixture. Criterion 1 was most accurate in quantifying mixtures with low (10 %) mallow content, and Criterion 2 was more effective in quantifying mixtures with more than 50% mallow. Proportions of 80 % mallow resulted in underestimation, independent of the estimation criterion applied.

KEY WORDS: *Sphaeralcea bonariensis*, Microhistology, Reading criteria, Similarity index.

Recibido el 6 de septiembre de 2005 y aceptado para la publicación el 1 de mayo del 2006.

^a Departamento de Ciencias Básicas Agronómicas. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. alicatan@ unse.edu.ar. Correspondencia al primer autor.

Proyecto de investigación subsidiado por Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Santiago del Estero.

El estudio de la composición botánica de la dieta de herbívoros domésticos permite identificar las especies que componen el forraje del ganado, y formular los programas de suplementación en casos de deficiencias nutricionales⁽¹⁾. Un método empleado para estimar la composición botánica es el microhistológico, que se basa en la identificación de caracteres epidérmicos, tales como células epidérmicas propiamente dichas, estomas, aparatos estomáticos, pelos, tricomas y glándulas; debido a que este análisis permite la identificación y cuantificación de los resultados, y el cual puede realizarse en heces, contenidos ruminales o mezclas manuales⁽²⁾.

Uno de los errores señalados al cuantificar las especies vegetales presentes en las dietas de herbívoros al emplear el método microhistológico, es la gran proporción de fragmentos no identificables o no cuantificados, tales como los tricomas que se desprenden de la epidermis de las especies vegetales en el proceso de digestión⁽³⁾.

La determinación de una porción de tejido vegetal, depende de la observación e identificación de células epidérmicas, estomas, tricomas y otros apéndices dérmicos. Los tricomas muestran un amplio rango de formas y estructuras, y poseen un considerable valor de diagnóstico a nivel taxonómico. Este valor taxonómico de los tricomas se reconoce por medio de la anatomía sistemática de la histología⁽⁴⁾.

Sphaeralcea bonariensis (Cav.), Pl Lorentz (malva), es una latifoliada anual importante en la dieta de caprinos del Chaco semiárido, con altos porcentajes de presencia en dietas de verano, otoño y primavera^(5,6); sin embargo, se observa que en los preparados microscópicos de dietas digeridas o mezclas, esta especie presenta pelos o tricomas desprendidos de la epidermis y sueltos en el campo microscópico. Malva es frecuentemente sub o sobre evaluada, según el criterio de lectura que se aplique empleando el método microhistológico, lo que implica una lectura inexacta que conlleva a errores en el manejo del ganado menor⁽⁷⁾. Algunos autores concluyeron a partir de sus trabajos con mezclas, que la subestimación de especies o la sobrevaluación de las mismas en los análisis al microscopio, depende en parte de las características propias de la especie en observación⁽⁸⁾.

Analyzing the botanical composition of domestic herbivore diets is necessary for identifying plant species in livestock forage and formulating supplement programs to address any nutritional deficiencies⁽¹⁾. Microhistology is frequently used to estimate botanical composition and is based on identification of epidermal characteristics such as epidermal cells, stomata, stomatic apparatus, hairs, trichomes and glands. This method is used because it allows identification and quantification of the analyzed material and can be done using feces, ruminal contents or manual mixtures⁽²⁾.

A common problem in microhistological quantification of vegetal species in herbivore diets is the large proportion of unidentifiable, or unquantified, fragments, such as trichomes detached from the epidermis of the species under digestion⁽³⁾.

Proper determination of a fragment of vegetal tissue depends on observation and identification of epidermal cells, stomata, trichomes and other dermal appendices. Trichomes exhibit a wide range of shapes and structures and are quite valuable for taxonomic diagnosis; recognizing trichomes is done using systematic histological anatomy⁽⁴⁾.

Sphaeralcea bonariensis (Cav.), Pl Lorentz (mallow) is a latifoliate annual that grows in the semiarid Chaco region of Argentina and forms a high percentage of goat diets during the summer, autumn and spring^(5,6). Quantifying mallow in microscopic preparations, however, can prove difficult because this species presents hairs or trichomes detached from the epidermis in the microscopic field of vision. As a result, it is frequently over- or underestimated, depending on the reading criteria used in the microhistological technique⁽⁷⁾. Some authors concluded that the miss estimation depends also of the characteristics of the species under observation, and this can lead to inexact readings and consequent errors in small livestock management⁽⁸⁾.

Proper quantification of mallow using the epidermis allows the adequate estimation of intake for these types of latifoliate in herbivore diets. This micro histological technique is recommended for estimation of dry weight composition of mixtures of species from semiarid zones^(1,9).

La cuantificación correcta de malva por medio de las epidermis, permitiría la adecuada estimación del consumo de este tipo de latifoliadas en la dieta de animales herbívoros. Se recomienda la técnica microhistológica empleada para estimar la composición en peso seco de las mezclas conformadas por especies propias de zonas semiáridas^(1,9).

Con el propósito de mejorar la determinación de la composición dietaria de los herbívoros que pastorean en las zonas semiáridas de la región del Chaco, en el presente trabajo se compararon dos criterios para la estimación de malva usando la técnica microhistológica: 1) sólo fragmentos epidérmicos como lecturas positivas, y 2) fragmentos epidérmicos o más de cuatro pelos/campo microscópico como lecturas positivas.

Se trabajó con cuatro mezclas manuales, de composición desconocida para el microscopista, conformadas por epífita (*Tillandsia sp.*), leñosa (*Prosopis nigra*), malva (*Sphaeralcea bonariensis*) y gramínea (*Sorghum halepensis*) (Cuadro 1). La composición de cada mezcla fue una simulación de la presencia de malva en el semiárido, en función del ciclo fenológico de la especie, según lo observado en la dieta de caprinos por otros investigadores, puesto que la malva es abundante tanto en el campo como en la dieta de los herbívoros durante el verano y el otoño, mientras que su presencia disminuye durante el invierno y la primavera, que constituyen la época seca^(5,6).

Para la confección de las mezclas, se recolectaron hojas de las especies estudiadas, previa identificación botánica de las mismas. Estas hojas

In an effort to improve determination of herbivore diet composition in livestock grazed in the semiarid Chaco region, a comparison was made of two mallow content estimation criteria using the microhistological technique: 1) epidermis fragments only as positive readings; and 2) epidermis fragments, or three or more hairs/microscopic field as positive readings.

Four manual mixtures were used in the trial and the microscope technician was not informed of their composition. The mixtures contained an epiphyte (*Tillandsia sp.*), a ligneous species (*Prosopis nigra*), mallow (*Sphaeralcea bonariensis*) and a gramínea (*Sorghum halepensis*) (Table 1). Each mixture's composition simulated the mallow proportion in goat diets in the semiarid region as a function of its phenological cycle. Mallow is abundant in the environment and in herbivore diets in the summer and autumn, the rainy season, and decreases in the winter and spring, the dry season^(5,6).

The mixtures were prepared by first collecting leaves from the studied species after botanical identification of the plants. These leaves were placed in separate paper bags by species, dried in an oven to constant weight at 60 °C (approx. 5 to 6 d) and ground in a Mill grinder. Once ground the leaves were screened through 1mm mesh to homogenize the material and the mixtures formulated. Each mixture was treated following the modified technique⁽¹⁰⁾. Readings were done at 100X with a Galen III microscope, using 10 slides per treatment per criterion, previously determined transects, and 20 fields per slide per criterion.

The slide reading technique applied was the appearance frequency of identifiable fragments⁽⁴⁾.

Cuadro 1. Composición botánica de las cuatro mezclas (g)

Table 1. Botanical composition of the four mixtures (g)

	Mixture 1 (%)	Mixture 2 (%)	Mixture 3 (%)	Mixture 4 (%)
<i>Sphaeralcea bonariensis</i>	0.15 (10)	0.37 (25.0)	0.75 (50.0)	1.2 (80.0)
<i>Tillandsia sp.</i>	0.45 (30)	0.50 (33.3)	0.50 (33.3)	0.1 (6.7)
<i>Sorghum halepensis</i>	0.45 (30)	0.40 (26.7)	0.12 (8.0)	0.1 (6.7)
<i>Prosopis nigra</i>	0.45 (30)	0.22 (15.0)	0.13 (8.7)	0.1 (6.7)

se secaron separadas por especie, en bolsas de papel, colocadas en estufa hasta peso constante a 60 °C (entre 5 y 6 días) y se molieron con molino tipo Mill. Las hojas molidas se tamizaron con malla de 1 mm para homogeneizar el material y se realizaron las cuatro mezclas. Cada mezcla fue tratada según la técnica modificada⁽¹⁰⁾. De cada mezcla se censaron 10 portaobjetos por cada criterio a 100 aumentos, utilizando transectos prefijados anteriormente, con 20 campos por portaobjetos por cada criterio. Las lecturas se realizaron con microscopio Galen III.

Se empleó la técnica de lectura de frecuencia de aparición de fragmentos identificables⁽⁴⁾. Para cada preparado se calculó el porcentaje respectivo de cada planta considerando sólo la presencia de epidermis (criterio 1), y considerando la epidermis o tres pelos o más sueltos en el campo como aparición positiva (criterio 2).

Los valores obtenidos a partir de ambos métodos se compararon con la composición real en peso seco de cada mezcla, empleando para ello un índice de similitud (i), de la forma:

$$i = 2w / (a + b)$$

Donde w es la suma de los valores mínimos comunes entre a y b ; a es la suma de los porcentajes reales de la mezcla y b es la suma de los porcentajes estimados para cada planta de la mezcla⁽¹¹⁾.

Los valores de índices de similitud se sometieron al análisis de la varianza con un procesador estadístico⁽¹²⁾, analizándolo como un experimento factorial con diseño completamente aleatorizado⁽¹³⁾.

Entre las lecturas realizadas en las mezclas se encontraron campos con pelos sin presencia de epidermis de malva (Figura 1), casos que se contabilizaron como una lectura positiva como criterio 2, y ninguna lectura positiva como criterio 1. Se localizaron campos microscópicos con epidermis de malva y pelos adheridos a ella (Figura 2), casos que se contabilizaron como una lectura positiva para el criterio 1. La estimación del peso seco de cada mezcla para los dos criterios, destaca que el valor estimado de malva varía en función de la composición de la mezclas (Figura 3).

Calculations of plant percentages in each preparation were done using a positive appearance based on presence of only epidermis (Criterion 1) or presence of epidermis, or three or more detached hairs in the microscope field of vision (Criterion 2).

A comparison was made between the values generated using the two criteria and the actual dry weight composition of each mixture, employing the similarity index (i):

$$i = 2w / (a + b)$$

Where w is the sum of the minimum values shared between a and b ; a is the sum of the actual percentages of the mixture; and b is the sum of the percentages estimated for each plant in the mixture⁽¹¹⁾.

An Anova was applied with the similarity values using a statistical program⁽¹²⁾, and treated as a factorial experiment with a completely random design⁽¹³⁾.

Readings of the mixtures included fields with mallow hairs and no epidermis (Figure 1), which were deemed a positive reading under Criterion 2, but a negative under Criterion 1. Other fields were

Figura 1. Microfotografía (100X) de campo microscópico con dos pelos estrellados de malva, sin identificación de epidermis

Figure 1. Microphotograph (100X) of microscope field showing two mallow hairs without epidermis

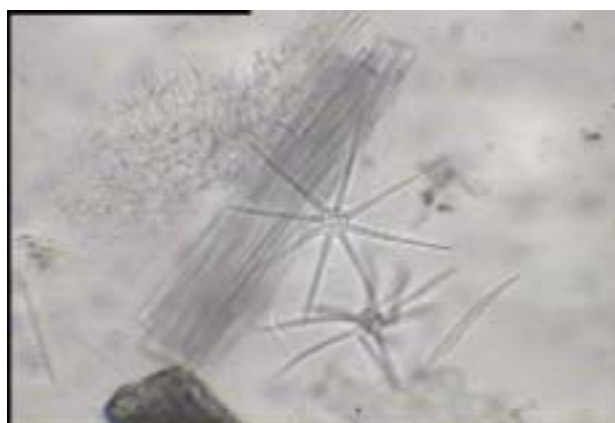


Figura 2. Microfotografía (100x) de campo microscópico con epidermis de malva y pelos sujetos a la misma

Figure 2. Microphotograph (100x) of microscope field with mallow epidermis and attached hairs



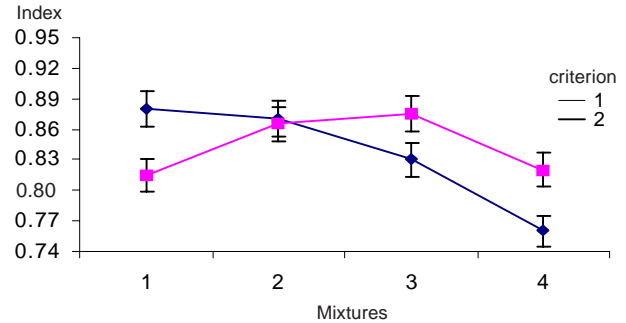
Se probaron los supuestos del análisis de la varianza del experimento factorial con diseño completamente aleatorizado (4x2), mediante la prueba de Cochran para la homogeneidad de varianzas, y la prueba de Shapiro Wilks para la determinación de la normalidad de los datos. Se registraron diferencias significativas entre los índices de similitud en función de la variación de la composición de las mezclas y también en la interacción (Cuadro 2).

En relación a las diferentes composiciones de las mezclas, los datos indican que cuando la proporción de malva fue de 80 % en la mezcla, existían diferencias para ambos criterios de lectura en los resultados. La abundancia de malva en las mezclas, lleva a la subvaloración de las mismas, tanto en la lectura de epidermis solas o epidermis + pelos. No ocurre lo mismo, cuando la proporción de malva es menor de 80 %.

Los índices de similitud alcanzan menor valor a medida que aumenta el porcentaje de malva en las mezclas, debido a que existe interacción entre criterios de lectura y composición porcentual de la mezcla. La presencia de pelos estrellados permite identificar a la malva en mezclas con especies de zonas semiáridas, donde ésta es importante en épocas húmedas⁽¹⁴⁾. Cuando la proporción de malva

Figura 3. Interacción de dos criterios x cuatro mezclas en malva

Figure 3. Interaction criterion mixtures of mallow



Criterion 1= presence of epidermis; Criterion 2= epidermis or 3 or more hairs in microscopic field.

observed containing mallow epidermis with attached hairs (Figure 2), which were counted as a positive reading under Criterion 1. Dry weight estimation of each mixture for each criterion demonstrated that the estimated mallow value varied as a function of mixture composition (Figure 3).

The assumptions of the Anova of the completely randomized (4x2) factorial experiment were tested with a Cochran test for variance homogeneity and the Shapiro-Wilkes test for determining data normality. Significant differences were found between the similarity indices as a function of variation in mixture composition and in the interaction between reading criteria and mixture composition (Table 2).

Mixture composition affected reading values. When mallow proportion was 80 %, it was underestimated using either criterion, which did not occur in the mixtures containing less than 80 % mallow.

Due to an interaction between reading criteria and mixture composition, the similarity indices decreased in value as mixture mallow percentage increased. Presence of stellate hairs allows identification of mallow in mixtures of species from semiarid zones, where it constitutes an important forage resource during the rainy season⁽¹⁴⁾. When mallow proportions were high, significant statistical differences occurred in the similarity index,

es elevada contrastan las diferencias estadísticas significativas en el índice de similitud, lo que revela que esta especie es subvaluada, independientemente del criterio empleado para la cuantificación de la misma. El valor del índice de similitud indica cuánto más semejante es cada estimación de peso seco al peso real, y no detecta diferencias para las mezclas que presentan 10, 25 y 50 % de malva en su composición. Por lo tanto debería encontrarse un factor que permita asegurar la estimación del peso seco de la Malvácea cuando la oferta de la misma es elevada en la pradera.

Si la proporción de malva es relativamente baja en la mezcla, la mejor aproximación al peso real de la composición de la mezcla es el criterio 1 (sólo epidermis); para el caso de elevadas proporciones de malva en las mezclas (más de 50 %) se recomienda el criterio 2, es decir, considerando fragmentos epidérmicos y presencia de tres o más pelos sueltos por campo epidérmico como anotación positiva, para evitar la subvaloración de esta especie. Dado que las mezclas trataron de reflejar la abundancia de malva en el campo, debería proyectarse la experiencia al trabajo de dietas en pruebas de preferencia, para determinar si en el verano y otoño, cuando la abundancia de malva es elevada, la misma es subvaluada en la cuantificación mediante el uso de la técnica microhistológica. La determinación del criterio de lectura a emplear para determinar la composición de la dieta de rumiantes, estará en relación a la oferta de malva en el campo, para disminuir la sub o sobre valuación de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento por el apoyo financiero recibido del Consejo de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (CICyT-UNSE).

LITERATURA CITADA

1. Holechek JL, Vavra M, Pieper RD. Methods for determining the nutritive quality of ruminant diets: a review. *J Anim Sci* 1982;54:363-372.

Cuadro 2. Prueba de diferencias de medias para índices por técnicas

Table 2. Differences of means test for indices by criteria*

Criterion	Mixtures	Means	
1	4	0.76	A
2	4	0.81	B
2	1	0.82	B
1	3	0.83	B C
2	2	0.86	C D
1	2	0.87	D
2	3	0.88	D
1	1	0.88	D

*DLS Fzher; DMS=0.03574; error 0.0016; df 72.

ABCD: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

indicating that in these cases this species was underestimated, independent of the quantification criterion used. The similarity index indicates how similar each dry weight estimation is to the real weight. No differences were observed in this index for the mixtures with 10, 20 and 50 % mallow. A factor is thus needed to ensure proper estimation of Malvacea dry weight when it accounts for over 50 % of herbivore diets.

When the mallow proportion was relatively low the best approximation to a mixture's real weight was produced using Criterion 1 (i.e. just epidermis). High proportions of mallow (> 50 %), however, were more accurately evaluated using Criterion 2 (i.e. epidermis fragments or three or more detached hairs per epidermic field) for positive readings to prevent underestimation of this species. Given that the mixtures used here were produced in an attempt to reflect mallow abundance in the environment, further research is needed on diets in preference tests to determine if when mallow abundance is high (i.e. summer and autumn) its quantification is underestimated when using the microhistological technique. Development of microscopic reading criteria for use in determining ruminant diet composition will need to consider the mallow available in the environment to reduce over- or underestimation of this species.

2. Pelliza de Sbriller A. Acerca de la microhistología. Comunicación Técnica N° 32. Recursos Naturales. Dieta. INTA 1993.
3. Westoby M, Rost GR, Weis J. Problems with estimating herbivore diets by microscopically identifying plant fragments from stomachs. *J Mammal* 1976;57:167-172.
4. Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of the Dicotyledons. II° ed. Oxford Clarendon Press; 1979.
5. Catán A, Degano CAM, Renolfi R, Larcher L, Martiarena R. Composición botánica y amplitud de la dieta de caprinos que pastorean en un bosque del Chaco semiárido. *Rev Fac Agron (LUZ)* 1999;16:451-460.
6. Degano C, Catán A, Renolfi R. Composición Botánica de la Dieta Estacional de Cabras Adultas. XXI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia 2001;545-550.
7. Holechek JL, Gross B. Evaluation of different calculation procedures for microhistological analysis. *J Range Manage* 1982;35(6):721-723.
8. Dearden BR, Hansen RM, Steinhorst RK. Analysis of the discernibility of plant species during digestion. Tech Rep 261. Grassland Biomed. U.S. International Biological Program 1974.
9. Catán A. Informe final de Beca de Iniciación: Evaluación de métodos microhistológicos para especies del semiárido. CICyT-UNSE. Sgo del Estero, Argentina. 2000.
10. Catán A, Degano C, Larcher L. Modificaciones a la técnica

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Consejo de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (CICyT-UNSE) for its financial support.

End of english version

microhistológica de Peña Neira para especies forrajeras del Chaco Semiárido Argentino. *Quebracho* 2003;10:71-75.

11. Bray JR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 1957;27:325-349.
12. Statgraphics Plus for Windows. 3.0 Copyright © 1994-1997 by Statistical Graphics Corp.
13. Robles C, Werenitzky D. Curso de estadística básica. Cátedra de Estadística Experimental, Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina. 1995.
14. Rumbaugh MD, Mayland HF, Pendery BM, Shewmaker GE. Utilization of globemallow (*Sphaeralcea*) taxa by sheep. *J Range Manage* 1993;46:103-109.

