

EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ÁCIDO CIANHÍDRICO SEGÚN ALTURA DEL CULTIVO Y ESTRATOS DE ALTURA EN PLANTAS DE SORGO FORRAJERO AZUCARADO DESTINADO AL PASTOREO

Bolatti J. ¹; Caeiro L. ¹; Urquidi Reyes A. ¹; Tablada M.¹; Lorenzon M. ² y Bernáldez, M.L. ^{1,3*}

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba; Avda. Ing. Agr. Felix Aldo Marrone 746, Córdoba (5000). ²

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos; Ruta Pcial. 11 Km. 10.5, Oro Verde, Entre Ríos (3101).

³Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María; Av. Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba (5900).

*maria.laura.bernaldez@unc.edu.ar

EVALUATION OF HYDROCYANIC ACID RELEASE BASED ON CROP HEIGHT AND HEIGHT STRATA IN FORAGE SORGHUM FOR GRAZING

Resumen

La liberación de ácido cianhídrico (HCN) en *Sorghum bicolor* (L.) estimada mediante la técnica de Guignard, es una manera fácil y rápida para determinar el potencial riesgo de intoxicación para los animales, que puede ser causa de muerte cuando el HCN alcanza las dosis tóxicas. El objetivo fue evaluar la liberación de HCN en sorgo azucarado, a cuatro alturas diferentes del cultivo y entre estratos dentro de la planta definidos como los tres tercios de la altura total, para estimar la probabilidad de riesgo de intoxicación en el manejo del pastoreo. Para realizar la evaluación cualitativa de liberación de HCN, en un sorgo forrajero azucarado, se utilizó una escala colorimétrica asociada a concentraciones de HCN (ppm) en tejido vegetal fresco. Los datos se transformaron en una variable binaria de riesgo-no riesgo para estimar la probabilidad de riesgo de intoxicación a través de una regresión logística. Se consideró riesgo a las lecturas asociadas a 40 ppm o más, de HCN liberado. Los resultados indicaron que la probabilidad de intoxicación disminuye a medida que aumenta la altura del cultivo ($p < 0,10$) y que existe diferencia significativa entre el estrato superior y los otros estratos analizados ($p < 0,10$).

Palabras clave: durrina, annual grass, megathermic, grazing, toxicity.

Abstract

The Guignard technique estimates the release of hydrocyanic acid (HCN) in *Sorghum bicolor* (L.), a quick and simple method to assess the potential risk of animal poisoning. High doses of HCN can be fatal to animals. The objective of the study was to assess

the release of HCN in sugar sorghum at four different crop heights and within three thirds of the total plant height to estimate the risk of poisoning in grazing management. A colorimetric scale associated with HCN concentrations (ppm) in fresh plant tissue was used to qualitatively evaluate HCN release in sugar forage sorghum. The data was converted into a binary variable to estimate the probability of intoxication risk through logistic regression. It was found that risk was linked to readings of 40 ppm or more of released HCN. The results showed that the likelihood of poisoning decreased with increasing crop height ($p < 0.10$) and there was a significant difference between the upper stratum and the other strata analyzed ($p < 0.10$).

Key words: durrina, gramínea anual, megatérmica, pastoreo, toxicidad.

Introducción

El *Sorghum bicolor* (L), conocido como sorgo, es una gramínea tropical anual originaria de Asia y África, adaptada a diversos ambientes mediante mejoramiento genético. Se destaca por su resistencia a la sequía, gracias a un sistema radicular ramificado, una capa de cera en hojas y tallos, presencia de células motoras en las hojas, numerosos estomas pequeños y la capacidad de "reposo vegetativo" durante la sequía (Smith and Frederiksen, 2000).

El sorgo se utiliza para la producción de granos y forraje. Entre los sorgos forrajeros, los azucarados poseen baja capacidad de rebrote, alta producción de materia seca y elevado contenido de azúcar que los convierte en materiales adecuados para la confección de silajes, y mayor contenido de un metabolito especializado llamado durrina, en comparación con los sorgos forrajeros sudaneses, comúnmente utilizados para pastoreo directo (Giorda, 2018).

La durrina es un glucósido cianogenético (GC) específico del sorgo que lo protege del ataque de insectos, le otorga tolerancia a la sequía y participa en el metabolismo y almacenaje de nitrógeno (Giantin et al., 2024). Este metabolito se acumula tanto en raíces como en brotes, observándose altas concentraciones en las hojas jóvenes (Emendack et al., 2017). Su producción es variable según cultivares (Blomstedt et al., 2012) y condiciones ambientales (Gruss et al., 2022). Bajo estrés por sequía o frío, las plantas acumulan más durrina (Rosati et al., 2019).

La durrina es inofensiva hasta que se descompone mediante hidrólisis enzimática y libera ácido cianhídrico (HCN), el cual es tóxico para los animales. La hidrólisis de la durrina y liberación de HCN ocurre cuando las células de la planta se rompen por la masticación del animal, permitiendo el contacto entre el GC y la enzima que se encuentran en diferentes tejidos (Panter, 2018; Gensa et al., 2019). Los microorganismos ruminales poseen

enzimas glucosidasas que producen HCN a partir de los glucósidos cianogénicos (Gruss et al., 2022).

En una intoxicación por HCN se produce anoxia histotóxica que afecta el sistema nervioso y se manifiesta con sintomatología que finalmente causa la muerte del animal (Gensa et al., 2019).

La dosis tóxica de HCN en bovinos es de 2 – 2,3 mg/kg de peso vivo (EFSA, 2007). Algunos autores recomiendan que las concentraciones de durrina no deben superar las 40 ppm (Bavera, 2007) o 50 ppm en base a tejido vegetal fresco (European Parliament and Council, 2002), para evitar que el animal alcance la dosis tóxica. Consecuentemente, conocer la concentración de HCN en sorgo adquiere gran relevancia a la hora de evitar intoxicaciones. No obstante, también se deben considerar variables del animal y del manejo de la alimentación, tales como: tasa de ingestión del forraje, estrato de la planta consumido, tasa de liberación de HCN, especie animal, estado de salud y bienestar del animal, posibilidades de detoxificación, tasas de excreción (Panter, 2018), proporción de la pastura en la dieta total y otros ingredientes de la dieta (EFSA, 2007; Gensa et al. 2019), para reconocer el riesgo real.

Para prevenir la toxicidad con HCN en bovinos pastoreando sorgo forrajero, las recomendaciones más frecuentes son: evitar el pastoreo de sorgos jóvenes o de rebrotes nuevos; no ingresar con ganado hambriento, alimentar al ganado con heno o granos antes del pastoreo, evitar el pastoreo después de una helada o cuando una lluvia haya puesto fin a una sequía de verano; aprovechar el sorgo en forma de heno o ensilaje, y analizar muestras representativas de cualquier forraje sospechoso antes de utilizarlo como alimento (Gallarino, 2008; Roozeboom et al., 2012).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la liberación de ácido cianhídrico en sorgo forrajero azucarado mediante la técnica de Guignard a distintas alturas del cultivo y en diferentes fracciones.

Materiales y Métodos

El 17 de noviembre de 2023 se sembró un híbrido de sorgo azucarado (*Silage King*, Corteva Agriscience™) en un lote productivo ubicado en camino a Capilla de los Remedios, Km 15,5 (31° 28 49,42" S y 64°00 36,04" O), provincia de Córdoba, Argentina. Se utilizó una densidad de siembra de 51 semillas/m² y una profundidad de siembra de 4 cm. El poder germinativo de la semilla fue 88%. Antes de la siembra se realizó la aplicación de un herbicida sistémico y 10 días después se aplicó un herbicida desecante. No se aplicaron herbicidas pre-emergentes ni se practicaron fertilizaciones al cultivo. El coeficiente de logro, a los 15 días desde la siembra, fue del 63%.

Se evaluó la liberación de HCN del forraje producido a los

32, 40, 47 y 55 días desde la siembra (DDS), cuando la altura promedio del cultivo, estimada desde 5 cm del suelo y con hoja extendida, fue de 28,78 cm ($\pm 11,67$), 64,23 cm ($\pm 17,84$), 84,40 cm ($\pm 16,49$) y 140 cm ($\pm 11,7$), respectivamente. Para tal fin, se tomaron muestras en 4 cuadrantes del lote eligiendo plantas completas, que contaran con la altura promedio del lote, que se trasladaron al laboratorio envueltas en papel periódico y dentro de conservadoras con hielo.

Se evaluó la liberación de HCN, considerando la planta entera (PE) y tres fracciones de la altura total: el tercio basal (estrato basal = EB), el tercio medio (estrato medio = EM) y el tercio superior (estrato superior = ES). Se llevó a cabo la Técnica de Guignard que usa papel picrosódico como reactivo que vira de color ante la presencia de HCN (Bavera, 2009), siguiendo las recomendaciones que sugieren Müller-Schwarze (2009) y Gianuzzi (2018) para la preparación del papel reactivo.

Se realizó la lectura cualitativa de los resultados de la técnica de Guignard, por observación visual teniendo como referencia una escala colorimétrica de 9 colores asociados a 9 rangos de concentración de HCN liberado por el material vegetal fresco evaluado (Aristizábal y Sánchez, 2007).

Se llevó a cabo un análisis estadístico para estimar la probabilidad de riesgo de intoxicación por HCN en bovinos en pastoreo, mediante un modelo de regresión logística usando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2020). Se consideró un nivel de significancia de 0,10. Para este análisis, los datos obtenidos en las lecturas de color fueron convertidos en una variable binaria: RIESGO y NO RIESGO de intoxicación con HCN, considerando RIESGO a las muestras cuya lectura se correspondían a concentraciones de más de 40 ppm.

En el modelo de regresión logística se consideró que la altura promedio de las plantas del lote al momento de muestrear y el estrato en el que se determinó el contenido de HCN, podrían afectar la probabilidad de riesgo de intoxicación. El modelo puede expresarse como:

$$\log \left(\frac{p}{1-p} \right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3$$

Donde p es la probabilidad de riesgo, 1-p es la probabilidad de no riesgo, x1 es la altura promedio del lote y x2 y x3 son variables auxiliares para representar a los estratos.

En el caso de las determinaciones realizadas con la planta entera el modelo de regresión solo consideró como variable predictora a la altura promedio de las plantas del lote.

Resultados y Discusión

La dinámica de la disminución de la probabilidad del riesgo, según el modelo de regresión logística utilizado, consideró un

modelo probabilístico para los resultados obtenidos y estimó valores p para los efectos estudiados.

Considerando las determinaciones de HCN para la planta entera, la probabilidad del riesgo disminuyó significativamente ($p=0,0936$) al aumentar la altura promedio del lote (Tabla 4). Son escasos los antecedentes en los que se reporta la altura de planta recomendada para el pastoreo seguro de sorgos forrajeros azucarados, tampoco las fichas técnicas de materiales comerciales hacen referencia a estas recomendaciones. Esto se debe a que el destino más frecuente de los sorgos forrajeros azucarados es la confección de silajes (De León, 2007). No obstante, Gallarino (2008) propone una altura entre 100 a 120 cm de la planta en reposo, como momento o adecuado para el pastoreo de sorgos azucarados por presentar baja posibilidad de intoxicación con HCN. El lote productivo en que se llevó a cabo el presente trabajo fue pastoreado por vacas de cría a los 55 DDS y con 140 cm de altura, estimada con la última hoja extendida, sin que se manifestaran problemas de envenenamiento en los animales.

Tabla 1

Valores ajustados para la probabilidad de riesgo de intoxicación por HCN según un modelo de regresión logística que considera como variable predictora a la altura promedio de las plantas.

Altura promedio del lote (cm)	Valor ajustado para el riesgo
28,78	0,87
64,23	0,73
84,40	0,62
140,00	0,28

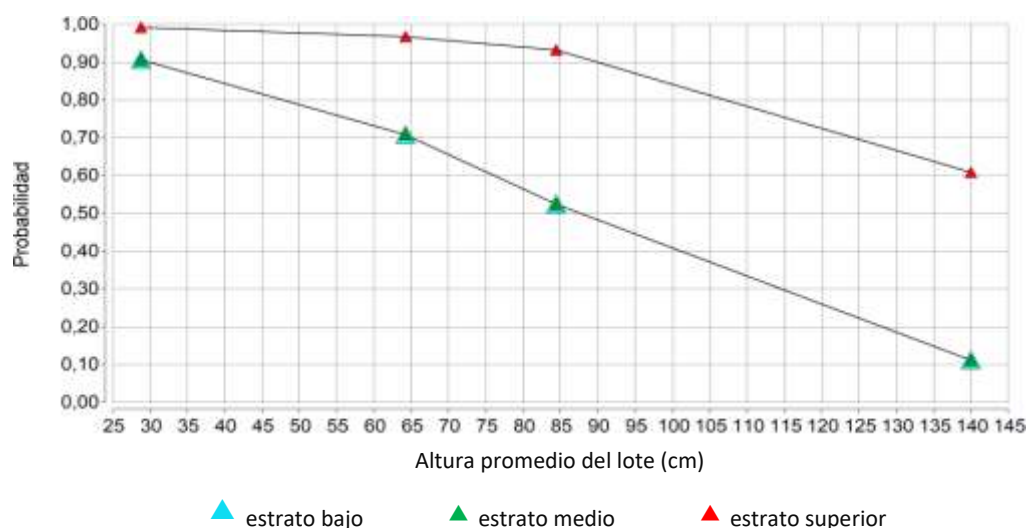
En el análisis de regresión que consideró la altura promedio y las fracciones de las plantas, los resultados muestran (Figura 1) que la liberación de HCN disminuye conforme aumenta la altura del cultivo ($p=0,003$) y que hubo diferencias a nivel de estrato ($p=0,0806$). A medida que la planta creció en altura para una misma altura los estratos bajos y medios fueron de menor riesgo que el tercio superior ($p= 0,0323$), sin presentar diferencias significativas entre sus niveles ajustados de riesgo ($p>0,10$).

Es posible que una multiplicidad de procesos que ocurren en una planta: tasa de crecimiento, aparición de hoja nuevas, tasa de senescencia, translocación entre órganos, macollaje, aparición de nudo reproductivo, cambios en la composición química celular de los tejidos (Panter, 2018), puedan explicar las diferencias encontradas entre los estratos y sustenten la idea de que en el estrato superior prevalecen tejidos vegetales jóvenes, más precisamente tejido foliar, en los que la acumulación de durrina es

mayor (Emendack et al., 2017).

Figura 1

Valores ajustados para la probabilidad de riesgo de intoxicación por estratos (bajo, medio y superior) para las cuatro alturas promedio del cultivo.



Conclusión

En este trabajo, se evidenció que tanto la altura de la planta como el estrato contribuyen a que se modifique la probabilidad de riesgo de intoxicación por CHN.

Las alturas del cultivo evaluadas mostraron diferencias en la probabilidad de provocar intoxicación con HCN, con una disminución del riesgo de intoxicación cuando incrementa la altura del forraje evaluado.

Los resultados obtenidos no muestran diferencias entre los estratos bajos y medios para cada altura estudiada, pero sí entre éstos y el estrato superior. Al avanzar el ciclo la disminución del riesgo de intoxicación en el material vegetal de los estratos medio y bajo fue muy notable con respecto a la reducción en el estrato superior.

Al avanzar el crecimiento de las plantas la proporción de tejido proveniente de los estratos con menor riesgo parece "mitigar" los posibles efectos tóxicos asociados a los tejidos del estrato superior.

El estudio de la dinámica del riesgo de intoxicación a través de los estratos de altura contribuyó a explicar las recomendaciones tradicionales para el pastoreo del sorgo.

Los reactivos e insumos de laboratorio necesarios para llevar a cabo el

presente trabajo fueron adquiridos gracias al aporte financiero de la Secretaría General de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Bibliografía

- Aristizábal J. y Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Boletín de servicios agrícolas de la FAO 163: 61-108.
- Bavera G. (2009). Reacción de Guignard (para ácido cianhídrico). Sitio Argentino de Producción Animal. Repositorio Digital de Acceso Abierto. 2 pags. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/94-guignard.pdf
- Blomstedt C. K.; Gleadow R. M.; O'Donnell, N., Naur, P., Jensen, K., Laursen, T., Olsen, C. E., Stuart, P., Hamill, J. D., Møller, B. L., and Neale, A. D. (2012). A combined biochemical screen and TILLING approach identifies mutations in *Sorghum bicolor* L. Moench resulting in acyanogenic forage production. *Plant Biotechnology Journal*, 10:54-66.
- De León M. 2007. El uso de silajes de sorgo en la intensificación de los sistemas de producción de carne bovina. Sitio Argentino de Producción Animal. Repositorio Digital de Acceso Abierto. 5 pags. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/94-silo_sorgo.pdf
- Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; Gonzalez L.; Tablada M.; and Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Emendack Y. Y.; Hayes C. M.; Chopra R.; Sanchez J.; Burow G.; Xin Z. and Burke J. J. (2017). Early seedling growth characteristics relate to the staygreen trait and dhurrin levels in sorghum. *Crop Science*, 45:404-415.
- EFSA, European Food Safety Authority (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to cyanogenic compounds as undesirable substances in animal. *The EFSA Journal*, págs. 434,
- European Parliament and Council (2002). European Commission Directive N° 32/2002 on undesirable substances in animal feed. *Off. J. Eur. Union L 2002*, 140, 10-22.
- Gallarino H. (2008). Manejo de sorgos forrajeros, su aprovechamiento. *Marca Líquida Agropecuaria*, 18(180):52-54.
- Gensa U. (2019). Review on Cyanide Poisoning in Ruminants. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 9(6):1-12.
- Giannuzzi L. (2018). Toxicología general y aplicada. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Editorial de la Universidad de La Plata. Pp.203.
- Giantin S.; Franzin A.; Brusa F.; Montemurro V.; Bozzetta E.; Caprai E.; Fedrizzi G.; Girolami F. and Nebbia C. (2024). Overview of Cyanide Poisoning in Cattle from *Sorghum halepense* and *S. bicolor* Cultivars in Northwest Italy. *Animals* 14:743-759.
- Giorda L. M. (2018) Variedades e híbridos forrajeros en sorgo. Trabajo presentado en el Congreso 2018 de AAPRESID, Córdoba, Argentina. <https://www.engormix.com/agricultura/genetica-sorgo/variedades-hibridos->

forrajeros-sorgo_a42668/

Gruss M.S.; Johnson K.D.; Ghaste M.; Widhalm J.R.; Johnson S.K.; Holma J.D. Obourf A.; Aiken R.M. and Tuinstra M.R. (2023). Dhurrin stability and hydrogen cyanide release in dried sorghum samples. *Field Crops Research* 291 (2023) 108764

Müller-Schwarze D. (2009). *Hands-on chemical ecology: Simple field and laboratory exercises*. Springer Science & Business Media.

Panter K. E. (2018). Cyanogenic glycoside-containing plants. In: *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles*, 2nd ed. (R. C. Gupta ed.). Ed. Elsevier Inc. pp. 936-947.

Roozeboom K, Mengel D., Blasi D., and Holman J. (2012). Prussic Acid Poisoning. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. 2 pags. https://bookstore.ksre.ksu.edu/download/prussic-acid-poisoning_MF3040

Rosati V. C.; Blomstedt C. K.; Møller B. L.; Garnett T. and Gleadow R. (2019). The interplay between water limitation, dhurrin, and nitrate in the low-cyanogenic sorghum mutant adult cyanide deficient class 1. *Frontiers in Plant Science*.

Smith C. W. and Frederiksen R. A. (2000). In: *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*. (C.W. Smith and R.A. Frederiksen, eds.). Ed. Texas A&M University Press. 849 pags.