



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

***Nierembergia rivularis* Miers (Solanaceae): taxonomía,
morfología, fenología y toxicología de un agente etiológico de
calcinosis enzoótica en Uruguay**

MARCELA NOEL PRELIASCO ARIN

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
2024

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

***Nierembergia rivularis* Miers (Solanaceae): taxonomía,
morfología, fenología y toxicología de un agente
etiológico de calcinosis enzoótica en Uruguay**

MARCELA NOEL PRELIASCO ARIN



Rodolfo Rivero García
Director de Tesis



Franklin Riet-Correa
Co-director

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

María del Carmen García y Santos Milburn; DMTV, MSc, PhD, SNI
Unidad Académica de Toxicología, Facultad de Veterinaria
Universidad de la República, Uruguay
- Presidenta de Tribunal -

Ramiro Alberto Zanonianni Correa; Ing. Agr., Esp., MSc
Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía
Universidad de la República, Uruguay

Juan Agustín García; Vet., MSc, PhD
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina



Centro de Posgrados y Educación Permanente
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

**ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE
MAESTRÍA**

ORIENTACIÓN: Maestría en Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 30/10/2024

TRIBUNAL: Dra. Carmen García y Santos (presidente), Dr. Ramiro Zanoniani, Dr. Agustín García.

| CI | NOMBRE | CALIFICACIÓN | NOTA |
|-----------|------------------------------|--------------|------|
| 3983737-9 | PRELIASCO ARIN, MARCELA NOEL | S.S.S. | 12 |

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

CARMEN GARCÍA Y SANTOS

R. A. Zanoniani

Juan Agustín García

TRIBUNAL

FIRMA

A Luciana,

mi hermosa y dulce niña.

“Son muchas las manos y los corazones que contribuyen al éxito de una persona”.

Walter E. Disney

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi orientador de tesis y gran amigo, el Dr. Rodolfo Rivero. Por siempre creer en mí y ayudarme en cada etapa de este increíble camino que resultó la realización del posgrado.

También, al Dr. Franklin Riet-Correa por todas sus enseñanzas, colaboración y apoyo, brindada siempre con la calidez y generosidad que caracterizan su persona.

Muchas gracias a las autoridades del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca por brindarme el apoyo necesario que requerí para la realización de este trabajo.

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme la Beca de Posgrado Nacional (maestría) 2020 que constituyó un gran apoyo para la realización del posgrado.

Un profundo agradecimiento a la Plataforma de Salud Animal del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), en la persona de su Coordinador Dr. Alejo Menchaca, por su invaluable apoyo y colaboración que hicieron posible la realización de este trabajo. También al Lic. Quim. Facundo Ibáñez, Ing. Alim. Irene Purtscher, Lab. Daniel Bassahún, Ing. Agr. Alejandro García y Dr. Mizaél Machado, quienes desde INIA colaboraron con el desarrollo de esta tesis.

Nuestro reconocimiento a la Ing. Agr. Ana Celina González de la Facultad de Agronomía de UDELAR, cuya dirección y aportes fueron fundamentales para la realización de este trabajo. También al Lic. Biol. Ary Mailhos quien tan amablemente contribuyó con su trabajo de estudio de comunidades vegetales, trabajos en herbario y asesoramiento botánico.

Muchas gracias a los encargados de los Herbarios consultados: Lic. Biol. Ary Mailhos (MVFA), Lic. Biol. Meica Valdivia (MVM), Lic. Biol. Federico Haretche y Sra. Adriana García (MVJB), y al Lic. Quim. Gastón Martínez (MVFQ), quienes muy amablemente pusieron a disposición su tiempo y conocimiento.

A los compañeros de la Oficina Zonal Paso de los Toros de la División de Sanidad Animal del MGAP, particularmente a la Dra. Aldana Balserini, por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Un cálido agradecimiento al Dr. Carlos Schild por su colaboración y valiosos aportes para el desarrollo de esta tesis.

Muchas gracias a la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, UDELAR, por sus recomendaciones y asesoramiento.

Muchas gracias a la Lic. Biol. Lorena Milanesi y al Lic. Biol. Andrea Arístides Cocucci de CONICET, quienes muy amablemente realizaron aportes desde su experiencia como investigadores en la química de plantas calcinogénicas y la biología de *Nierembergia spp.* respectivamente.

Quisiera agradecer muy especialmente a los productores agropecuarios que participaron en esta investigación. También a los profesionales veterinarios e ingenieros agrónomos del departamento de Tacuarembó que colaboraron en el desarrollo de este trabajo: Dr. Ignacio Freire, Dr. José Baptista, Dr. Mauricio Alonso, Ing. Agr. Andrés Degrossi, Dr. Rafael Rodríguez, Dr. Juan Carlos Neves y Dr. Andrés Degrossi.

Muchas gracias al Jefe del Grupo de Artillería N° 3 por poner a disposición el Campo Militar Santa Isabel para el estudio de *Nierembergia rivularis*. También al Tte. Cnel. Rodrigo Tavárez y a todo el personal de dicho Campo Militar por su colaboración en la realización de necropsias y toma de muestras de las plantas.

Gracias a los compañeros de la Unidad de Epidemiología del MGAP, particularmente al Dr. Gabriel Mautone y Dr. Edgardo Vitale, quienes cálidamente me prestaron su tiempo, herramientas y asesoramiento.

Muchas gracias a la Ing. Agr. Mónica Cadenazzi, Ing. Agr. Pablo Boggiano e Ing. Agr. Ramiro Zanoniani de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía (UDELAR) en Paysandú, por su asesoramiento y apoyo.

Gracias al Dr. Enrique Morelli, Dra. Stella Santos y Dra. Patricia González de Facultad de Ciencias (UDELAR) por sus aportes en entomología.

Un cálido agradecimiento al Dr. Fernando Dutra por todo su apoyo y colaboración en el empleo de la Base de Datos de la UNIRADD y por sus valiosos aportes en las áreas de diagnóstico y patología. También a la Dra. Florencia Pieruccioni y Dr. Joaquín Armúa quienes muy amablemente brindaron su apoyo desde el Laboratorio de Patología de DILAVE.

A las Dras. Carolina Matto y Fabiana López y los demás compañeros de DILAVE Paysandú y DILAVE Tacuarembó por su colaboración y apoyo constantes.

Muchas gracias al Tec. Agr. Daniel Acosta y al Dr. Marcelo Rodríguez por su cálido apoyo y colaboración en las gestiones concernientes al desarrollo de esta tesis en el MGAP. También a mis compañeros de DILAVE Sr. Ramón Berisso, Sr. Mario Di Lorenzi y Sr. Javier Piriz quienes tan amablemente colaboraron en la logística de las salidas de campo.

Mi agradecimiento a las Sras. Adriana Barrios, Elisa Ferreira, Vivian Álvarez, Marilí Arrúa, Sandra Sosa y María Pía Montes de Oca por su valiosa colaboración en las gestiones concernientes a esta tesis.

Gracias al personal de biblioteca de Facultad de Veterinaria, quienes brindaron con gran disposición su colaboración en la búsqueda de bibliografía.

Un cálido agradecimiento a la Dra. Sulamita Collazo por brindarme siempre todo su apoyo, su consejo y su amistad. También a mis compañeros y amigos Sr. Mario Bentancor, Daysi Piñeiro y Dr. Pablo Alonzo quienes me enseñaron sus habilidades en patología y compartieron conmigo los más gratos momentos.

Un gran agradecimiento a la Lic. Adriana Ponzoni por acompañarme en el transcurso de un largo proceso que hizo posible alcanzar este preciado objetivo. Por tanto, muchas gracias.

Un cálido agradecimiento a mi familia, amigas y amigos, quienes siempre estuvieron allí, apoyándome en cada etapa. Quisiera mencionar particularmente a mi madre, Sra. Adriana Arin, quien puso a disposición su casa, sus herramientas, su arte y todo su amor.

A mi hermana Gabriela Preliasco por acompañarme y ayudarme en el registro fotográfico de lesiones de necropsia. A mi padrino, Sr. Marcelo Arin, por realizar el marco de hierro empleado para medir la densidad de la planta en el campo. A mi sobrino Juan Diego por acompañarme y colaborar en la recolección de muestras de suelo y registro nocturno de la planta. Y al Lic. Marcos Hernán Bonjour por todo su apoyo, tiempo, conocimiento y amor.

Quisiera por último plasmar en este documento el mayor de los agradecimientos a mi hija Luciana. La persona que cada día me impulsa a ser mejor profesional, persona y mamá.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| GLOSARIO DE ABREVIATURAS | 3 |
| INTROUCCIÓN | 4 |
| El género <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pavón..... | 4 |
| Historia y taxonomía | 4 |
| Morfología y biología..... | 7 |
| Importancia en medicina veterinaria | 11 |
| Vitamina D y su metabolismo..... | 14 |
| Síntesis, metabolismo y funciones de la vitamina D en animales vertebrados | 14 |
| Síntesis, metabolismo y funciones de la vitamina D en las plantas | 15 |
| Plantas calcinogénicas y calcinosis enzoótica..... | 16 |
| ANTECEDENTES ESPECÍFICOS | 19 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 22 |
| HIPÓTESIS..... | 24 |
| OBJETIVOS | 24 |
| Objetivos Generales | 24 |
| Objetivos Específicos..... | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| Relevamiento de información sobre el género <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. en Uruguay..... | 25 |
| Confirmación taxonómica de <i>Nierembergia</i> a nivel especie en establecimientos foco de calcinosis enzoótica..... | 25 |
| Selección de los sitios de muestreo para el estudio de <i>Nierembergia rivularis</i> | 25 |
| Estudios sobre la morfología de <i>Nierembergia rivularis</i> | 26 |
| Estudios de masa y materia seca de <i>Nierembergia rivularis</i> | 27 |
| Cálculos de masa de <i>Nierembergia rivularis</i> | 28 |
| Estudios sobre el contenido de materia seca de <i>Nierembergia rivularis</i> | 28 |
| Pruebas estadísticas | 28 |
| Observaciones sobre el ciclo fenológico y la biología floral de <i>Nierembergia rivularis</i> | 28 |
| Identificación de insectos que interactúan con las flores de <i>Nierembergia rivularis</i> | 29 |
| Caracterización de la comunidad vegetal en parches de ocurrencia de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | 29 |
| Estudio de las características físico-químicas de suelos donde crecen comunidades de <i>Nierembergia rivularis</i> | 29 |
| Identificación y cuantificación de principios activos de <i>Nierembergia rivularis</i> | 30 |
| RESULTADOS..... | 32 |
| Relevamiento de información sobre el género <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. en Uruguay..... | 32 |

| | |
|--|------|
| Confirmación taxonómica de <i>Nierembergia</i> a nivel especie en establecimientos foco de calcinosis enzoótica..... | 33 |
| Estudios sobre la morfología de <i>Nierembergia rivularis</i> | 34 |
| Estudios de masa y materia seca de <i>Nierembergia rivularis</i> | 40 |
| Cálculos de masa de <i>Nierembergia rivularis</i> | 40 |
| Estudios sobre el contenido de materia seca de <i>Nierembergia rivularis</i> | 40 |
| Observaciones sobre el ciclo fenológico y la biología floral de <i>Nierembergia rivularis</i> | 41 |
| Identificación de insectos que interactúan con las flores de <i>Nierembergia rivularis</i> | 41 |
| Caracterización de la comunidad vegetal en parches de ocurrencia de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | 42 |
| Estudio de las características físico-químicas de suelos donde crecen comunidades de <i>Nierembergia rivularis</i> | 45 |
| Identificación y cuantificación de principios activos de <i>Nierembergia rivularis</i> | 46 |
| DISCUSIÓN | 47 |
| CONCLUSIONES | 54 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 55 |
| ANEXOS..... | I |
| Anexo I. Información adicional sobre las especies de <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. aceptadas actualmente | I |
| Anexo II. Materiales y metodología empleados para los análisis físico-químicos de suelos.. | VI |
| Anexo III. Materiales y metodología empleados para la cuantificación de vitamina D ₃ y sus derivados hidroxilados | VIII |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|-----|
| Cuadro I. Clasificación taxonómica del género <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav..... | 5 |
| Cuadro II. Nombres populares de las especies de <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. | 6 |
| Cuadro III. Descripción botánica del género <i>Nierembergia</i> | 9 |
| Cuadro IV. Brotes de intoxicación por <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. reportados en Uruguay, discriminados por establecimiento | 20 |
| Cuadro V. Características de sitios de muestreo para el estudio de <i>Nierembergia rivularis</i> | 26 |
| Cuadro VI. Muestreo de plantas para cuantificación de vitamina D y sus derivados | 31 |
| Cuadro VII. Especies de <i>Nierembergia</i> y su distribución departamental en Uruguay reportados en la bibliografía | 32 |
| Cuadro VIII. Registros en herbarios de las especies de <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav y su distribución departamental en Uruguay | 33 |
| Cuadro IX. Morfometría de los rizomas de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | 34 |
| Cuadro X. Morfometría de las hojas de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | 36 |
| Cuadro XI. Morfometría de las flores de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | 38 |
| Cuadro XII. Masa de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers en sitios de muestreo A1 y A2..... | 40 |
| Cuadro XIII. Masa de las partes aéreas y subterráneas de <i>Nierembergia rivularis</i> | 40 |
| Cuadro XIV. Materia seca de <i>Nierembergia rivularis</i> | 41 |
| Cuadro XV. Comunidades vegetales en predios con ocurrencia de <i>Nierembergia rivularis</i> | 44 |
| Cuadro XVI. Características físico-químicas de suelos donde existen comunidades de <i>Nierembergia rivularis</i> | 45 |
| Cuadro XVII. Vitamina D y sus derivados hidroxilados en <i>Nierembergia rivularis</i> | 46 |
| Cuadro XVIII. Sinonimia de las especies de <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. aceptadas en la clasificación taxonómica vigente | I |
| Cuadro XIX. Información de los autores y las publicaciones originales de las especies de <i>Nierembergia</i> aceptadas actualmente..... | III |
| Cuadro XX. Distribución geográfica de las especies de <i>Nierembergia</i> en la bibliografía | V |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución geográfica mundial del género <i>Nierembergia</i> Ruiz y Pav. | 7 |
| Figura 2. <i>Nierembergia linariifolia</i> | 11 |
| Figura 3. <i>Nierembergia riograndensis</i> | 13 |
| Figura 4. <i>Nierembergia calycina</i> | 14 |
| Figura 5. Morfología de <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | 35 |
| Figura 6. Rizoma de <i>Nierembergia rivularis</i> | 35 |
| Figura 7. Láminas foliares de <i>Nierembergia rivularis</i> | 36 |
| Figura 8. Planta de <i>Nierembergia rivularis</i> | 37 |
| Figura 9. Flor de <i>Nierembergia rivularis</i> (vista lateral) en diferentes etapas de apertura | 37 |
| Figura 10. Flor de <i>Nierembergia rivularis</i> (vista aérea) | 38 |
| Figura 11. Flor de <i>Nierembergia rivularis</i> bajo lupa estereoscópica | 39 |
| Figura 12. Gránulo de polen de <i>Nierembergia rivularis</i> | 39 |
| Figura 13. <i>Astylus quadrilineatus</i> (Melyridae)..... | 42 |
| Figura 14. Abeja recolectora de aceites de la Tribu <i>Tapinotaspidini</i> | 42 |

RESUMEN

Calcinosis enzoótica asociada a la intoxicación por *Nierembergia* Ruiz y Pav. es un problema sanitario que afecta la producción de ovinos y bovinos. Se realizó un trabajo descriptivo con el objetivo de estudiar la presencia de las especies de *Nierembergia* en Uruguay y generar información sobre la morfología, fenología y toxicología de *Nierembergia rivularis* Miers. Se consultaron las colecciones botánicas de cuatro herbarios y se registró la información sobre las especies de *Nierembergia* y su distribución por departamento. Se concurreó a los establecimientos donde se reportaron brotes de calcinosis enzoótica asociados a la intoxicación por especies de *Nierembergia* para realizar la confirmación taxonómica de especie en el Herbario de Facultad de Agronomía. Se realizó un estudio descriptivo de *N. rivularis* que contempló su morfología, masa relativa, masa total, materia seca, distribución de masa, ciclo fenológico, caracterización de comunidades vegetales y características físico-químicas de cuatro suelos donde habita. Se cuantificó el contenido de derivados hidroxilados de vitamina D presentes en las diferentes estructuras mediante HPLC. Los resultados de este trabajo revelaron que Uruguay cuenta con nueve especies de *Nierembergia* distribuidas heterogéneamente en el territorio nacional. Se descartó la presencia de *Nierembergia repens* y *Nierembergia veitchii* en Uruguay, confirmando a *N. rivularis* como la especie responsable de los brotes de calcinosis enzoótica por *Nierembergia* reportados en la bibliografía. Se caracterizó a *N. rivularis* como una planta perenne, de pequeño porte (longitud media del pecíolo de la hoja de 2,4 cm, y longitud media de la lámina foliar de 1,7 cm), con tallos radicales que le permiten una reproducción asexual clonal (principal forma de propagación de esta especie). Sus flores pentalobadas de color blanco en sus dos tercios externos y amarillas en el tercio interno, presentaron tricomas capitados en la garganta de la corola y un tubo corolino largo (hasta 58 mm de longitud) y firme que sostiene la corola de la flor en una posición semi paralela a la línea del suelo, exponiendo sus estructuras de reproducción sexual (cinco estambres y un pistilo). Se constató la interacción de abejas nativas recolectoras de aceites de la tribu *Tapinotaspidini* con las flores de *N. rivularis*. Esta planta presentó una masa subterránea (tallos y raíces) hasta 7 veces mayor en base verde, y hasta 15,5 veces superior en base seca, a la masa de sus estructuras aéreas (hojas y flores). La presencia de *N. rivularis* en el campo osciló entre 0,7 y 46,1%. Las condiciones ambientales en las que se presentó en mayor proporción relativa son suelos de textura arenosa-arcillosa, anegables, con baja competencia por el espacio subterráneo y exposición solar directa permanente. Se constató el contenido de derivados hidroxilados de vitamina D en todas las estructuras de *N. rivularis*, confirmando la capacidad que posee esta planta de acumular sustancias calcinogénicas. Este trabajo representa una aproximación preliminar al estudio de un agente etiológico de la calcinosis enzoótica presente en Uruguay. Continuar con esta línea de investigación es importante para el desarrollo de estrategias para la prevención de esta enfermedad.

SUMMARY

Enzootic calcinosis associated with *Nierembergia* Ruiz y Pav. poisoning is a sanitary issue affecting sheep and cattle production. A descriptive study was conducted to investigate the presence of *Nierembergia* species in Uruguay and to provide information on the morphology, phenology, and toxicology of *Nierembergia rivularis* Miers. Botanical collections from four herbariums were consulted, and information on *Nierembergia* species and their distribution by department was recorded. Visits were made to establishments where enzootic calcinosis outbreaks associated with *Nierembergia* poisoning were reported, to confirm species taxonomy at the Herbarium of the Faculty of Agronomy. A descriptive study of *N. rivularis* was performed, including its morphology, relative mass, total mass, dry matter, mass distribution, phenological cycle, plant community characterization, and physicochemical properties of four soils it inhabits. The content of hydroxylated vitamin D derivatives present in various structures was quantified using HPLC. The results revealed that Uruguay hosts nine *Nierembergia* species, distributed heterogeneously across the country. The presence of *Nierembergia repens* and *Nierembergia veitchii* in Uruguay was excluded, confirming *N. rivularis* as the species responsible for the reported enzootic calcinosis outbreaks in the literature. *N. rivularis* was characterized as a perennial, small-sized plant (average petiole length of 2.4 cm and average leaf blade length of 1.7 cm), with rooting stems that allow clonal asexual reproduction (the primary propagation method of this species). Its white, pentamerous flowers in the outer two-thirds and yellow in the inner third, exhibited capitate trichomes in the corolla throat and a long, firm corolla tube (up to 58 mm) that holds the flower corolla in a semi-parallel position to the soil line, exposing its sexual reproductive structures (five stamens and one pistil). Interaction with native oil-collecting bees of the *Tapinotaspidini* tribe was observed in *N. rivularis* flowers. This plant showed an underground biomass (stems and roots) up to 7 times greater in green weight and up to 15.5 times higher in dry weight compared to its aerial structures (leaves and flowers). The presence of *N. rivularis* in the field ranged from 0.7% to 46.1%. The highest relative proportions were observed in sandy-clay soils, waterlogged conditions, low underground space competition, and permanent direct solar exposure. Hydroxylated vitamin D derivatives were found in all structures of *N. rivularis*, confirming the plant's ability to accumulate calcigenic substances. This work represents a preliminary approach to studying an etiological agent of enzootic calcinosis present in Uruguay. Further research in this line is crucial for developing strategies to prevent this disease.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CIN: Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Hongos y Plantas.

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina).

DIEA: Oficina de Estadísticas Agropecuarias (MGAP).

DILAVE: División de Laboratorios Veterinarios (MGAP).

DSA: División de Sanidad Animal (MGAP).

EEMAC: Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”, Facultad de Agronomía, UDELAR.

IMM: Intendencia Municipal de Montevideo.

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

INUMET: Instituto Uruguayo de Meteorología.

IPNI: International Plant Names Index.

MEC: Ministerio de Educación y Cultura.

MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

MVFA: Herbario de la Facultad de Agronomía, Montevideo (UDELAR).

MVFQ: Herbario de la Facultad de Química, Montevideo (UDELAR).

MVJB: Herbario del Jardín Botánico, Montevideo (IMM).

MVM: Herbario del Museo Nacional de Historia Natural y Antropología, Montevideo (MEC).

POWO: Plants of the World Online (Royal Botanic Gardens, Kew).

UDELAR: Universidad de la República.

UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución).

UNIRADD: Unidad de Registros y Diagnósticos (DILAVE).

INTROUCCI3N

El g6nero *Nierembergia* Ruiz y Pav3n

Historia y taxonomía

El g6nero *Nierembergia* Ruiz y Pav. (familia Solanaceae) fue descrito por primera vez por los bot6nicos espa1oles Hip3lito Ruiz L3pez y Jos6 Antonio Pav3n y Jim6nez (1794) en su libro “Descripciones y l6minas de los nuevos g6neros de plantas de la flora del Per6 y Chile”. Esta obra recopila los principales hallazgos cient6ficos de la Expedici3n Bot6nica al Virreinato del Per6 que fue llevada a cabo por Espa1a entre los a1os 1777 y 1788, durante el reinado de Carlos III. Estos autores denominaron el g6nero *Nierembergia* en honor al te3logo, naturista y escritor espa1ol Juan Eusebio Nieremberg (1595-1658) (Ruiz & Pav3n, 1794). Cuatro a1os despu6s, Ruiz y Pav3n publicaron un nuevo manuscrito donde detallaron los hallazgos de la Expedici3n con mayor profundidad. En dicha obra se describi3 la primera especie del g6nero: *Nierembergia repens*, que fue hallada en Chile (Ruiz & Pav3n, 1798).

Desde entonces se realizaron numerosas expediciones y estudios sobre la flora sudamericana en las que se clasificaron nuevas especies de *Nierembergia*.

En su obra de 1941, Roberto Mill6n se1al3 que entre los a1os 1799 y 1898 se publicaron m6s de 40 especies y variedades de *Nierembergia*, muchas de las cuales pertenecían a otros g6neros o se referían a especies que ya habían sido identificadas con anterioridad. En su revisi3n, Mill6n redujo este n6mero a 30 especies y 16 variedades, excluyendo 17 antiguas denominaciones.

Dicho trabajo fue examinado y actualizado por los bot6nicos argentinos Andrea Arístides Cocucci y Armando Hunziker, quienes excluyeron 13 especies (pertenecientes a otros g6neros), agruparon especies sin3nimas y establecieron la actual clasificaci3n taxon3mica del g6nero *Nierembergia* que admite 21 especies y siete variedades (Cocucci & Hunziker 1993, 1995, 1995b). En el Cuadro XVIII del Anexo I se resume la sinonimia aceptada actualmente, discriminada por especie.

Nierembergia hatschbachii A.A.Cocucci & Hunz. y *N. riograndensis* Hunz. & A.A.Cocucci fueron las 6ltimas especies incluidas en la clasificaci3n. Las mismas fueron descritas a partir de material recolectado en los estados brasileros de Paran6 y Rio Grande do Sul (Cocucci & Hunziker, 1993).

La clasificaci3n taxon3mica propuesta por Cocucci y Hunziker se bas3 en características morfol3gicas, ubicando al g6nero *Nierembergia* dentro de la subfamilia Cestroideae (tribu Nicotianeae G. Don). Sin embargo, estudios filogen6ticos posteriores determinaron su transferencia a la subfamilia Petunioideae, grupo que integra junto a otros doce g6neros bot6nicos (Vignoli-Silva & Mentz, 2006). La clasificaci3n vigente del g6nero *Nierembergia* aparece detallada en el Cuadro I.

Existen numerosos nombres vulgares por los que son conocidas las especies de *Nierembergia* y varían seg6n la regi3n (Cuadro II).

Cuadro I. Clasificación taxonómica del género *Nierembergia* Ruiz y Pav.¹

| Taxón | Denominación |
|--------------------|--|
| Reino | Plantae |
| División | Tracheophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Solanales |
| Familia | Solanaceae Juss. |
| Sub-familia | Petunioideae Thorne & Reveal |
| Género | <i>Nierembergia</i> Ruiz & Pav. (= <i>Stimenes</i> Raf.) |
| Especies aceptadas | <i>N. angustifolia</i> Kunth <i>N. aristata</i> D.Don <i>N. browallioides</i> Griseb. <i>N. calycina</i> Hook. <i>N. ericoides</i> Miers <i>N. espinosae</i> Steyerm. <i>N. graveolens</i> A.St.-Hil. <i>N. hatschbachii</i> A.A.Cocucci & Hunz. <i>N. linariifolia</i> Graham – var. <i>glabriuscula</i> (Dunal) A.A.Cocucci & Hunz. – var. <i>linariifolia</i> – var. <i>pampeana</i> (Millán) A.A.Cocucci & Hunz. – var. <i>pinifolioides</i> (Millán) A.A.Cocucci & Hunz. <i>N. micrantha</i> Cabrera <i>N. pinifolia</i> Miers <i>N. pulchella</i> (Miers) Gillies – var. <i>longistyla</i> (Millán) A.A.Cocucci & Hunz. – var. <i>macrocalyx</i> (Millán) A.A.Cocucci & Hunz. – var. <i>pulchella</i> <i>N. repens</i> Ruiz & Pav. <i>N. rigida</i> Miers <i>N. riograndensis</i> Hunz. & A.A.Cocucci <i>N. rivularis</i> Miers <i>N. scoparia</i> Sendtn. <i>N. spathulata</i> Kunth <i>N. tandilensis</i> (Kuntze) Cabrera <i>N. tucumanensis</i> Millán <i>N. veitchii</i> Hook. |

var. = variedad. Referencias: Cocucci & Hunziker (1993, 1995, 1995b); Vignoli-Silva & Mentz (2006); POWO (2023); Zuloaga et al. (2023).

¹Son numerosos los autores que estuvieron involucrados en la denominación de las especies del género *Nierembergia*. Tal como lo establece el Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Hongos y Plantas (CIN), el nombre del autor que publica un nuevo taxón se sitúa a continuación del nombre del mismo. Para ello se utiliza el sistema de abreviaturas gestionada por el International Plant Names Index (IPNI; <http://www.ipni.org>). A su vez, cuando un autor cambia una especie de género, el epíteto se transfiere al nuevo género y se hace seguir del nombre del autor original entre paréntesis, seguido del nombre de quien ha efectuado la transferencia, ej. *N. pulchella* (Miers) Gillies. En botánica, el nombre científico bajo el cual fue originalmente nombrado o catalogado un taxón se conoce como basónimo o basiónimo (Sosef et al. 2021). En el Cuadro XIX del Anexo I se brinda información adicional sobre los autores y las publicaciones originales de las especies de *Nierembergia* actualmente aceptadas.

Cuadro II. Nombres populares de las especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav.

| País | Nombre vulgar de <i>Nierembergia</i> sp. |
|-----------|---|
| Argentina | Chuscho ² , Chucho, Chuscho de la sierra, Chuscho blanco, Chuscho violeta, Chucho violeta, Chuschus, Linillo, Mio, Ynambú-caá, Mata caballo, Campanilla, Campanilla venenosa, Yerba de los mosquitos |
| Uruguay | Chucho, Chucho violeta, Linillo |
| Brasil | Miomiquinho, Linho-do-mato, Vassourinha-roxa |
| Bolivia | Tonko tonko, Kawanus |
| Chile | Estrellita de las vegas ³ |

Referencias: Millán, 1941; Riet-Correa et al. 1993; Cocucci & Hunziker, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2006.

Distribución geográfica

El género *Nierembergia* es nativo del continente americano (principalmente del sudamericano), encontrándose en una amplia variedad de ambientes (praderas, bañados, zonas ribereñas, sierras y alta montaña hasta los 3500 metros sobre el nivel del mar) (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1995b; Cocucci, 2013).

Su distribución asciende desde el sur de Argentina (provincias de Río Negro y Neuquén) hacia el norte abarcando el resto del país, regiones centrales de Chile, Uruguay, estados del sur y sureste de Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro y Minas Gerais), Paraguay, Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia (Fig. 1). Fuera de esta área la única especie nativa se encuentra en México (*Nierembergia angustifolia* Kunth), no existiendo especies nativas de *Nierembergia* en América Central, Venezuela y las Guayanas (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1995b, Rodríguez et al. 2008, 2018; Cocucci, 2013; Villaseñor, 2016; Vignoli-Silva & Mentz, 2020; POWO, 2023).

Argentina es el país con mayor número de especies nativas de *Nierembergia* (15 de sus 21 especies), siendo las provincias de Catamarca y Tucumán las regiones que albergan la mayor diversidad (Cocucci, 1991, 2013; Cocucci & Hunziker, 1995b).

Hasta el momento *Nierembergia linariifolia* Graham es la única especie que ha sido introducida fuera de su área de distribución natural. La misma se ha naturalizado en la flora de Venezuela, Estados Unidos (estado de Texas), Australia (Nueva Gales del Sur) y países del sur de África (Botsuana, Sudáfrica, Mozambique y Zimbabue) (Fig. 1) (Shinners, 1963; Symon, 1981; Botha et al. 1999; Germishuizen & Meyer, 2003; Welman, 2003; Botha & Penrith, 2008; POWO, 2023).

² El nombre compuesto “*Chuschoyuyo*” (proveniente de las lenguas quechuas) significa “hierba que produce el chuscho”, siendo “chuscho” un término empleado para denominar a “temblores” y también “fiebre intermitente acompañada de escalofríos”. Esta denominación popular hace referencia a las propiedades tóxicas que poseen algunas especies de este género (Millán, 1941).

³ Haciendo alusión al término chileno “vega” que significa “terreno siempre húmedo”.

En el cuadro XX del Anexo I aparece detallada la distribución geográfica de las 21 especies de *Nierembergia* según la bibliografía.

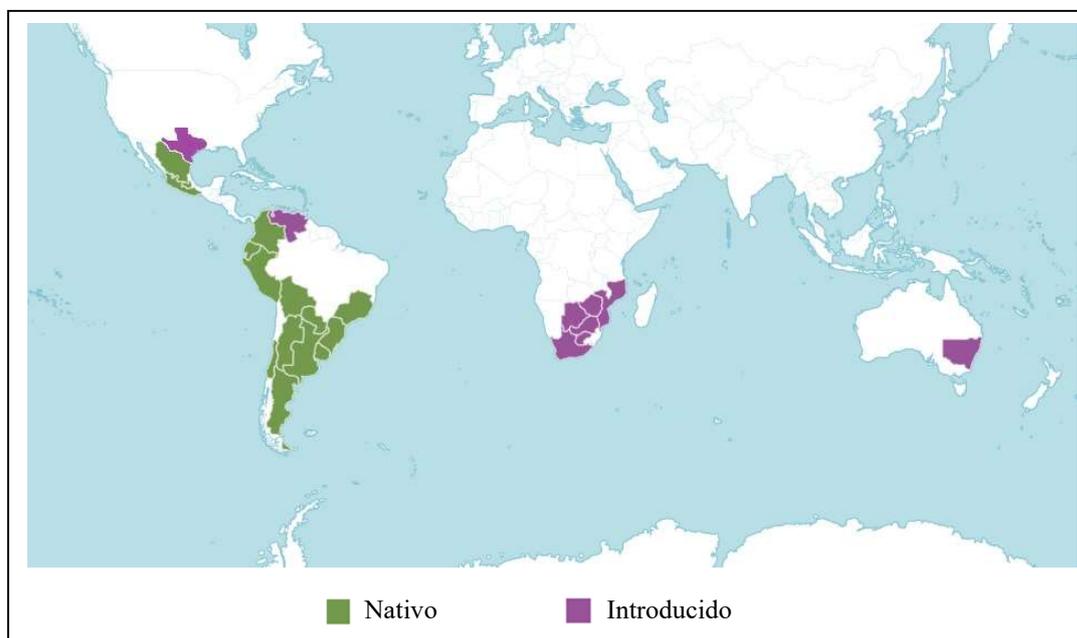


Figura 1. Distribución geográfica mundial del género *Nierembergia* Ruiz y Pav. En color verde aparecen representados los países donde el género es nativo para alguna de sus especies. En color violeta se muestran los países donde *Nierembergia* ha sido introducida, formando parte de la flora exótica. Imagen adaptada de POWO, 2023 (powo.science.kew.org).

Nierembergia linariifolia es cultivada con fines ornamentales en Estados Unidos, Inglaterra, Japón, Australia y Nueva Zelanda, donde se la conoce comúnmente como “cup flower” y “white cup”. En este sentido, es una especie valorada por la forma y el color de sus flores, así como su largo período de floración. Para la comercialización de sus semillas se desarrollaron las variedades “Mont Blanc”, “Summer Splash Compact White”, “Summer Splash Patio White” y “Lara White” (Miers, 1846, 1850; Symon, 1981; Vignoli-Silva & Mentz, 2006; Soto, 2007).

Morfología y biología

El género *Nierembergia* forma parte de la familia Solanaceae, distinguiéndose dos grandes grupos según sus hábitos. El primero incluye plantas leñosas que se presentan en forma de arbustos, mientras que el segundo está compuesto por plantas herbáceas que pueden ser erguidas o postradas (Tate et al. 2009). La descripción botánica del género *Nierembergia* aparece descrita en el Cuadro III.

La morfología y biología florales de *Nierembergia* Ruiz y Pav. presentan características particulares que las diferencian de las demás solanáceas (Cocucci, 1991; Tate et al. 2009).

La mayoría de las especies de *Nierembergia* poseen flores oleíferas carentes de nectario, es decir, flores que ofrecen aceites no volátiles como recompensa a los insectos que las polinizan (en lugar de néctar o polen). Estos aceites son segregados por tricomas glandulares (elaióforos) que se encuentran tapizando la superficie del limbo de la corola. En estas flores las líneas de orientación de la corola desempeñan la función de guiar a los polinizadores a la región secretora de aceites (Cocucci, 1991; Maubecin et al. 2021).

La presencia o carencia de elaióforos está relacionado con el tipo de reproducción sexual de estas plantas. Las especies que han perdido los elaióforos durante su evolución (*Nierembergia angustifolia*, *N. micrantha* y *N. spathulata*) presumiblemente son autógamas (Tate et al. 2009), mientras que en otras especies⁴ se ha demostrado la existencia de polinización cruzada (Cocucci, 1991).

Las flores oleíferas son polinizadas casi exclusivamente por abejas solitarias nativas que presentan estructuras especializadas (situadas en las patas generalmente) que usan para coleccionar, manipular y transportar los aceites (Maubecin et al. 2021). Las abejas que polinizan al género *Nierembergia* y que han sido estudiadas en Argentina corresponden a los géneros *Tapinotaspis*, *Chalepogenus*, *Lanthanomelissa* y *Paratetrapedia* (Cocucci, 1991; Vignoli-Silva & Mentz, 2006). Desde un punto de vista evolutivo, *Nierembergia* es un género especializado dentro de su tribu, por lo que es probable que su desarrollo morfológico (desaparición del nectario en favor de los elaióforos) se encuentre relacionado a la evolución de las poblaciones de abejas colectoras de aceites con las que interactúa (Cocucci, 1991; Tate et al. 2009). *Nierembergia* provee a estas abejas de alimento, refugio y un lugar para la reproducción, determinando que sean de gran importancia para la preservación de estas especies y los ecosistemas en las que se hayan presentes (Cocucci, 1991; Tate et al. 2009).

Otra característica destacable de las flores de *Nierembergia* es la gran longitud y firmeza del tubo de la corola, desempeñando la función de sostén y exhibición de las estructuras reproductivas de la flor, propiedad generalmente atribuida al pedicelo. Esto es particularmente importante en especies rastreras (ej. *N. rivularis* y *N. calycina*), en las que el tubo permite exponer las flores por encima de la vegetación circundante. A su vez, el tubo corolino asegura el posicionamiento del limbo en un eje horizontal, lo cual es fundamental para que los polinizadores puedan desempeñarse adecuadamente (Cocucci, 1991).

⁴ Las especies estudiadas por Cocucci (1991) (según la clasificación taxonómica actual) fueron *Nierembergia rivularis*, *N. aristata* (*N. stricta*), *N. scoparia* (*N. frutescens*) y *N. linariifolia* (*N. hippomanica*).

Cuadro III. Descripción botánica del género *Nierembergia*.

| Estructura de la planta | | Descripción |
|-------------------------|---------------|--|
| Generalidades | Hábito | Hierbas o arbustos Erguidas o postradas Pocos centímetros hasta 1,6 m de altura A veces con rizomas ⁵ o tubérculos ⁶ Fanerógamas ⁷ angiospermas ⁸ |
| | Ciclo vital | Anuales o perennes |
| Órganos vegetativos | Hojas | Simples ⁹ Sésiles ¹⁰ o pecioladas Solitarias o fasciculadas Lámina linear, elíptica, ovalada, obovada o circular |
| Flores | Generalidades | Solitarias o dispuestas en cimas laxas Diclamídeas ¹¹ Gamopétalas ¹² Actinomorfas ¹³ o ligeramente zigomorfas ¹⁴ Monóclinas ¹⁵ Carecen de aroma |
| | Cáliz | Infundibuliforme o campanulado Pentafendido ¹⁶ Tubo calicinal con 10 nervios longitudinales Generalmente persistente en el fruto |
| | Corola | Hipocraterimorfa ¹⁷ Pentalobada Color violeta (en la mayoría de las especies) o blanco Limbo ¹⁸ infundibuliforme o campanulado, simétrico o levemente asimétrico Tubo cilíndrico, muy estrecho |

⁵ Rizomas: tallos que crecen horizontalmente bajo la tierra, próximos a la superficie, del cual se originan ramas aéreas por su parte superior y raíces adventicias por la inferior. Al vivir fuera del alcance de la luz, carece de estructuras capaces de asimilar y de transpirar. En su lugar, en condiciones adversas como inviernos fríos o estaciones excesivamente secas, los rizomas defienden a las plantas contra los rigores ambientales.

⁶ Tubérculos: tallos subterráneos abultados, ricos en sustancias de reserva (ej. almidón, inulina), y en la superficie de los mismos suelen verse yemas y catafilos (hojas inferiores, generalmente en forma de escama, de consistencia membranácea, carentes de clorofila). Son formaciones transitorias, en general anuales.

⁷ Phanerógamas: también llamadas Antofitas, son plantas caracterizadas por presentar tejidos reproductivos especializados en alguna época de su vida.

⁸ Angiospermas: plantas fanerógamas caracterizadas porque el óvulo y la semilla se presentan contenidos en el interior de un ovario.

⁹ Hoja simple: aquella compuesta por una única lámina foliar que no se divide en porciones individuales.

¹⁰ Hoja sésil: aquella desprovista de pecíolo.

¹¹ Flor diclamídea: compuesta por doble perianto (verticilos florales), generalmente cáliz y corola.

¹² Flor gamopétala: aquella cuya corola posee los pétalos soldados entre sí.

¹³ Flor actinomorfa: aquella cuyos verticilos poseen al menos dos planos de simetría.

¹⁴ Flor zigomorfa: aquella cuyos verticilos posee un único plano de simetría (simetría bilateral).

¹⁵ Hermafroditas.

¹⁶ Provisto de cinco sépalos.

¹⁷ Corola hipocraterimorfa: corola gamopétala (de pétalos soldados entre sí) y tubulosa (tubo largo y angosto), pero con un limbo aplanado.

¹⁸ Limbo: en las corolas gamopétalas, la parte libre de los pétalos.

| | |
|--------------------------------|--|
| | Provista de una densa cubierta interna de tricomas ¹⁹ capitados ²⁰ , breves, rodeando la boca del tubo |
| Androceo ²¹ | Provisto de cinco estambres epipétalos ²² , insertos en el borde superior tubo corolino Homodínamo ²³ o heterodínamo ²⁴ Filamentos rectos o sigmoides con su porción basal cubierta de tricomas Anteras ditecas ²⁵ , ventrifijas ²⁶ , con dehiscencia ²⁷ longitudinal |
| Polen | Simple, en tétrades o agrupamientos mayores (másulas) |
| Gineceo | Ovario súpero ²⁸ , bicarpelar, gamocarpelar y bilocular, polispérmico, de placentación axial Estilo entero y filiforme Estigma ²⁹ semilunar o capitado, dispuesto apretadamente entre los estambres |
| Nectario ³⁰ | Ausente |
| Cáliz fructífero ³¹ | Acrescente ³² o no |
| Frutos | Cápsula elíptica De 6 a mm de largo Dehiscencia ²² apical por dos valvas bipartidas en el ápice |
| Semillas | Pequeñas (0,7 a 1,4 mm) Poliédricas o triángulas Con superficie retículo-ondulada o reticulada-lisa |
| Embrión | Recto o ligeramente curvo Cotiledones ³³ levemente mayores al resto del embrión |

Referencias: Cocucci, 1991; Cocucci & Hunziker, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2006.

¹⁹ Tricoma: excrecencia de la epidermis, variable en tamaño, forma y función, que constituye un resalto en la superficie de los órganos vegetales. Incluye varias categorías (pelos, papilas, escamas y otros).

²⁰ Capitado: más engrosado hacia la extremidad, con forma de cabeza.

²¹ Androceo: conjunto de estambres, órganos masculinos de la flor, que por lo general se disponen en uno o dos verticilos o ciclos.

²² Estambres epipétalos: estambres soldados a la corola.

²³ Androceo homodínamo: conjunto de estambres de la misma longitud.

²⁴ Androceo heterodínamo: androceo cuyos estambres tienen distinta longitud.

²⁵ Anteras ditecas: anteras compuestas por dos tecas, con sendas parejas de sacos polínicos.

²⁶ Anteras ventrifijas: anteras unidas al soporte por su cara ventral.

²⁷ Dehiscencia: fenómeno a través del cual un órgano se abre espontáneamente (fruto o antera).

²⁸ Súpero: ovario adherido al receptáculo sólo por su base.

²⁹ Estigma: porción apical de la hoja carpelar, adaptado para la retención y germinación del polen.

³⁰ Nectario: estructura epidérmica secretora de néctar, generalmente situada en las flores.

³¹ Cáliz: envoltura más externa de la flor, cumple una función protectora. Está formado por un conjunto de pequeñas estructuras llamadas sépalos.

³² Cáliz acrescente: cáliz que sigue creciendo aún después de fecundada la flor.

³³ Cotiledón: hoja u hojas embrionarias formadas en el embrión de las fanerógamas (vegetal que tiene órganos reproductores visibles).

Referencias: Torres, 1966; Font Quer, 2000.

Importancia en medicina veterinaria

Algunas especies de *Nierembergia* poseen propiedades tóxicas para el ganado provocando pérdidas para la producción agropecuaria:

a. *Nierembergia linariifolia* Graham

La toxicidad de *Nierembergia linariifolia* Graham (sin. *N. hippomanica* Miers) es bien conocida desde la década de 1840 (Millán, 1941). Su consumo es responsable de cuadros digestivos y nerviosos bovinos, ovinos y caprinos en Argentina y Uruguay (Millán, 1941; Oдини et al. 1995; Torino et al. 2017). También se han reportado brotes de intoxicación en países fuera del continente sudamericano donde esta especie es exótica (Botha et al. 1999). Las propiedades tóxicas de esta especie son atribuidas al contenido de alcaloides del tropano (escopolamina, tigloidina), de pirroles y alcaloides pirrolizidínicos (pirrol-3-carbamidina, higrina, norhigrina) (Buschi & Pomilio, 1987; Pomilio et al. 2008).

Morfológicamente son plantas herbáceas o sub-arbustivas, ramificadas desde la base, con numerosos tallos leñosos ascendentes (Fig. 2). Poseen tegumento pubescente, hojas lineares, lanceoladas o elípticas, sésiles, alternas a fasciculadas. Flores axilares que presentan un cáliz campanulado o infundibuliforme, cinco pétalos blancos trinervados, con nervaduras de color violáceo (Cocucci & Hunziker, 1995; Vignoli-Silva & Mentz, 2006). La amplia distribución geográfica y el gran polimorfismo que presenta esta especie determinó que fuera sobre-clasificada por diversos autores en el pasado (Cocucci & Hunziker, 1995).



Figura 2. *Nierembergia linariifolia*. Se observa una planta erecta, con pequeñas hojas lineares, sésiles y alternadas (A). Presenta flores axilares provistas de cinco pétalos fusionados de color blanco y lila con centro amarillo (B). Fuente: Instituto de Botánica Darwinion (darwin.edu.ar).

b. *Nierembergia riograndensis* Hunz. & A.A.Cocucci

Existen numerosos trabajos en la bibliografía que reportan y describen brotes de calcinosis enzoótica por intoxicación con *Nierembergia veitchii* en Brasil (Riet-Correa et al. 1987; Rissi et al. 2007, 2009). Su importancia es tal que entre los años 1978 y 1998 representó el 77,8% de todas las intoxicaciones por plantas en ovinos en el estado de Rio Grande do Sul (Riet-Correa & Medeiros, 2001). Otros autores reportan que calcinosis enzoótica por *Nierembergia* constituyó el 9,7% del total de los diagnósticos realizados en ovinos por el Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María entre los años 1990 y 2007, siendo la enfermedad de mayor frecuencia después de la haemonchosis (Rissi et al. 2010).

Sus propiedades calcinogénicas fueron comprobadas experimentalmente en ovinos (Riet-Correa et al. 1980, 1993b), pollos (Riet-Correa et al. 1987), conejos (Riet-Correa et al. 1981) y ratas (Mello et al. 2000).

Sin embargo, en el año 2006 Vignoli-Silva y Mentz realizaron una revisión del género *Nierembergia* Ruiz y Pav. en el estado brasilero de Rio Grande do Sul. Este trabajo consistió en la revisión bibliográfica, consulta de colecciones de herbarios y visitas a campo para relevamiento de especies de *Nierembergia* en todo el estado. Como parte de los resultados, las autoras realizaron la exclusión de *N. veitchii* de la lista de especies de *Nierembergia* presentes en Rio Grande do Sul debido a que no se encontraron ejemplares en las colecciones de herbarios consultadas ni en las exploraciones a campo. Paralelamente, las autoras concluyeron que *N. riograndensis* Hunz. & A.A.Cocucci fue erróneamente clasificada como *N. veitchii* Hook. en diversos reportes de calcinosis enzoótica en Brasil.

Cabe destacar que la publicación de la especie *Nierembergia riograndensis* fue posterior a los primeros brotes de calcinosis enzoótica en Brasil. Los mismos ocurrieron a finales de las décadas de 1960 y 1970 y fueron reportados por Barros et al. (1970) y Riet-Correa et al. (1981), respectivamente. La identificación y clasificación de *Nierembergia riograndensis* fue realizada por Cocucci y Hunziker en el año 1993.

Nierembergia veitchii es una especie nativa de las regiones central y noroeste de Argentina (provincias de Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán y Santiago del Estero) (Cocucci & Hunziker, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2006). Se diferencia morfológicamente de *N. riograndensis* en la forma del limbo de la corola, estigma y disposición de los gránulos de polen (Vignoli-Silva & Mentz, 2006).

Nierembergia riograndensis es una planta herbácea de 10 a 17 cm de altura, con ramificaciones ascendentes algo leñosas o decumbentes (Fig. 3). Hasta el momento se ha encontrado únicamente en el estado brasilero de Rio Grande do Sul, habitando campos secos y pedregosos (Cocucci & Hunziker, 1993; Vignoli-Silva & Mentz, 2006, 2020; Zuloaga et al. 2023).

De acuerdo a esta información, en la presente tesis se citará la especie *Nierembergia riograndensis* al referenciar los brotes de calcinosis enzoótica ocurridos en Brasil, a pesar de que se haya reportado a *N. veitchii* como agente etiológico en la bibliografía.



Figura 3. *Nierembergia riograndensis*. Se observa una planta ramificada desde la base con tallos ascendentes, hojas elípticas o lanceoladas, alternas y sésiles (A). Sus flores axilares poseen cinco pétalos blancos fusionados con el centro amarillo (B). Fuente: Prof. Sérgio Bordignon (floradigital.ufsc.br).

c. *Nierembergia rivularis* Miers

Nierembergia rivularis ha sido identificada como agente etiológico de calcinosis enzoótica en ovinos y bovinos en Uruguay (García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021). Se trata de una planta rastrera con tallos radicantes, de pocos centímetros de altura, que habita campos húmedos y anegables de zonas ribereñas (Cocucci & Hunziker, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2020). Su distribución se limita al sistema hidrográfico Paraná-del Plata en Argentina, Bolivia, Brasil y Uruguay (Cocucci & Hunziker, 1995b).

Las propiedades calcinogénicas de estas especies han sido comprobadas experimentalmente en ovinos (García y Santos et al. 2012) y bovinos (Schild et al. 2021).

d. *Nierembergia calycina* Hooker

Nierembergia calycina es una especie potencialmente calcinogénica ya que su consumo originó un brote de calcinosis enzoótica en ovinos en Tacuarembó (Schild Com. Pers. 2020). Actualmente se están llevando a cabo estudios para realizar la comprobación experimental de su toxicidad (Schild Com. Pers. 2023).

Es una planta rastrera, de hojas ovadas y semicirculares, pubescentes, con su pecíolo foliar muy corto (longitud menor a 5 mm) (Fig. 4), que se encuentra distribuida en Uruguay y la provincia argentina de Entre Ríos (Cocucci & Hunziker, 1995b).



Figura 4. *Nierembergia calycina*. Fotografías tomadas en las localidades de Cardozo Grande (Tacuarembó) el 14/10/23 (A), y Cufre (Colonia) el 31/10/21 (B y C). Se observa la disposición de tallos reptantes y ramificados (A). Sus flores solitarias son blancas, pentalobadas con centro de la corola amarillo (B) y tubo corolino largo (C). Emergen de forma solitaria a partir de un pedicelo corto (C). Sus hojas son pequeñas, ovadas, simples y opuestas (C).

Vitamina D y su metabolismo

Síntesis, metabolismo y funciones de la vitamina D en animales vertebrados

Químicamente los esteroides de la vitamina D son secosteroides derivados del colesterol porque poseen un anillo roto (B), y cuatro anillos intactos (A, C y D) (Norman, 2003).

En los animales el colecalciferol (vitamina D₃) se sintetiza en la piel a partir del 7-dihidrocolesterol. Éste es transformado en la previtamina D como consecuencia de la acción de los rayos UV que, a una longitud de onda entre 280 y 315 nm, rompen el enlace carbono-carbono 9,10. Posteriormente, la previtamina D sufre una isomerización espontánea mediada por temperatura que finalmente desencadena en la síntesis del colecalciferol (Boland et al. 2003; Mello, 2003; Norman, 2003; Milanesi et al. 2005; Saini et al. 2016). La vitamina D y sus metabolitos son transportados en el torrente sanguíneo ligados a la proteína de unión a la vitamina D (DBP), globulina sérica y en menor grado a la albúmina (Mello, 2003; Milanesi et al. 2005; Saini et al. 2016). En el hígado el colecalciferol sufre una primera hidroxilación mediada por varias enzimas mitocondriales y microsomales del complejo P450, de las cuales la 25(OH)D₃ 1- α hidroxilasa (CYP2R1) es la más importante. Estos procesos llevan a la formación de la 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃), también conocida como calcifediol, que constituye el metabolito de vitamina D con mayor circulación plasmática (Mello, 2003; Norman, 2003; Milanesi et

al. 2005; Saini et al. 2016). En el riñón, el complejo 25(OH)D₃-DBP es endocitado por las células de los túbulos renales proximales donde la enzima 25(OH)D 1- α hidroxilasa cataliza una segunda hidroxilación sintetizando la forma hormonal biológicamente activa de la vitamina D: 1,25-hidroxivitamina D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃), también denominado calcitriol (Mello, 2003; Norman, 2003; Milanesi et al. 2005; Saini et al. 2016).

Las actividades del calcitriol se encuentran mediadas por receptores específicos (VDR), encontrados en la membrana nuclear y citoplasmática de las células blanco en intestino, riñón y huesos (Boland et al. 2003; Norman, 2003; Milanesi et al. 2005; Saini et al. 2016). Sus principales acciones están vinculadas con la regulación de la homeostasis del calcio y el fósforo. A nivel intestinal estimula el reclutamiento de los canales de calcio en los enterocitos, induce la expresión de proteínas transportadoras de calcio (calbindinas), y facilita la entrada de calcio a la circulación desde la zona basolateral de las células intestinales mediante una bomba de vitamina D dependiente de ATP. En el hueso la vitamina D estimula la diferenciación de osteoblastos y la producción de proteínas de unión al calcio óseo (osteocalcina y osteopontina). Además, induce la producción de citoquinas y factores de crecimiento aumentando la actividad y la formación de los osteoclastos, y promueve la diferenciación de los condrocitos. En el riñón aumenta la reabsorción de calcio desde la orina, y estimula indirectamente la reabsorción urinaria de fósforo (Boland et al. 2003; Norman, 2003; Milanesi et al. 2005; Saini et al. 2016).

La existencia de receptores VDR en otros tejidos dan lugar a acciones de la vitamina D no relacionadas con la homeostasis del calcio. A nivel muscular interviene en la regulación del crecimiento y diferenciación celulares, la concentración del calcio intracelular y la contractilidad muscular (Boland et al. 2003; Milanesi et al. 2005). También desempeña funciones inmunomoduladoras (tanto en la inmunidad adaptativa como innata), endócrinas y reproductivas (Boland et al. 2003; Norman, 2003; Milanesi et al. 2005; Saini et al. 2016).

Síntesis, metabolismo y funciones de la vitamina D en las plantas

Se ha comprobado la presencia de provitamina D₃, vitamina D₃, 25(OH)D₃ (calcifediol) y 1 α ,25(OH)₂D₃ (calcitriol) en diversas especies de angiospermas, principalmente pertenecientes a la familia Solanaceae (Boland et al. 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013; Black et al. 2017). Esto ha sido demostrado a través de ensayos *in vivo* utilizando plantas enteras, e *in vitro* a través del estudio de cultivos celulares de plantas (Rambeck et al. 1981; Prema & Raghuramulu, 1996; Habib & Donnelly, 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Estos compuestos pueden encontrarse en su forma libre (liposoluble) y conjugados con glicósidos (hidrosolubles) (Curino et al. 2001; Boland et al. 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Ensayos experimentales demostraron que las formas glicosidadas de la vitamina D presentes en las plantas poseen una actividad biológica 90% a 95% mayor al de las formas libres de colecalciferol (Black et al. 2017).

Mientras los animales poseen un esteroil precursor de la vitamina D (7-dihidrocolesterol), las plantas presentan un complejo mixto de esteroides que incluyen el sitosterol, stigmasterol, ergosterol, 7-dihidrocolesterol, campesterol y 24-metilcolesterol (Black et al. 2017). El colesterol es un compuesto celular menor en la mayoría de las plantas (entre 1% y 2%), pero existen excepciones como plantas de la familia Solanaceae en las que el colesterol representa al menos el 10% de los esteroides totales (Jäpelt & Jakobsen, 2013; Black et al. 2017).

La síntesis de vitamina D en las plantas depende de una reacción fotolítica del 7-dihidrocolesterol, similar a lo que ocurre en la piel de los animales vertebrados (Jäpelt & Jakobsen, 2013; Black et al. 2017). Paralelamente, se ha demostrado la existencia de una ruta biosintética no fotolítica en cultivos de *Solanum glaucophyllum* (Solanaceae), en la que las plantas sintetizan vitamina D y sus derivados en ausencia de radiación UV. En estos casos se vio que la síntesis de calcitriol fue regulada por las concentraciones de calcio y factores de crecimiento presentes en los medios de cultivo (Curino et al. 2001). Sin embargo, estudios *in vitro* mostraron que la capacidad de producción de vitamina D por las plantas es entre 18 y 64 veces menor a través de la vía no fotolítica (Jäpelt & Jakobsen, 2013).

Paralelamente, diversos estudios han demostrado que la actividad calcinogénica de las plantas acumuladoras de vitamina D y sus metabolitos es dependiente de la intensidad de la radiación solar (regulada por la posición del sol y el ángulo de radiación) y la temperatura ambiente (Mello & Habermehl, 1991). El efecto de la temperatura ambiente sobre la producción de estos secosteroides se debe a que la de isomerización de la provitamina D a vitamina D₃ es una reacción termo-dependiente. La influencia de este factor fue comprobada experimentalmente (Jäpelt & Jakobsen, 2013).

Las funciones que la vitamina D y sus derivados cumplen en el metabolismo de las plantas han sido estudiadas de manera *in vitro* e *in vivo* en diferentes especies botánicas. La aplicación exógena de vitamina D y sus análogos como aditivo a plantas enteras y cultivos celulares ha demostrado poseer efectos de estimulación de la rizogénesis y producción de raíces adventicias (Buchala & Schmid, 1979), promoción de la germinación, elongación y diversos procesos de crecimiento radicular (Schmid & Buchala, 1987; Milanesi et al. 2005), regulación de la absorción celular de calcio (Habib & Donnelly, 2003), síntesis *de novo* de calmodulina (Milanesi et al. 2005), estimulación de ADN, proteínas y actividad mitótica a nivel radicular (Boland et al. 2003; Milanesi et al. 2005).

Plantas calcinogénicas y calcinosis enzoótica

Calcinosis enzoótica es el término que se emplea para referirse al cuadro clínico y patológico que desarrollan animales que consumen plantas calcinogénicas. Éstas poseen principios activos con acción metabólica similar a la vitamina D que interfieren directamente en el metabolismo del calcio y fósforo de los animales intoxicados, provocando la calcificación de tejidos blandos (Wasserman et al. 1976b; Mello, 2003; Tokarnia et al. 2000; Machado et al. 2020).

El primer brote de calcinosis enzoótica ocurrió en la provincia de Buenos Aires y fue reportado por Lignières en 1898 (Mello, 2003), aunque en ese momento se asoció la patología con una etiología infecciosa. Fue Collier quien en 1927 relacionó los cuadros de “Enteque seco” en bovinos con el consumo de *Solanum glaucophyllum* (antes conocido como *S. malacoxylon*) (Mello, 2003). Desde entonces se han reportado brotes de calcinosis enzoótica en varios países del mundo asociados al consumo de diferentes especies botánicas, en su mayoría angiospermas pertenecientes a la familia Solanaceae (Boland et al. 2003). De éstas se destacan *Solanum glaucophyllum* en Argentina, Brasil y Uruguay (Worker & Carrillo, 1967; Döbereiner et al. 1971; Riet-Correa et al. 1975; Okada et al. 1977), *Nierembergia riograndensis* (reportada como *N. veitchii*) en Brasil (Riet-Correa et al. 1987; Rissi et al. 2007, 2009), *Nierembergia rivularis* en Uruguay (García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021), *Cestrum diurnum* en Estados Unidos, Jamaica y Cuba (Durand et al. 1999), *Trisetum flavescens* en Austria, Alemania y Suiza (Braun et al. 2000), *Solanum torvum* en Estados Unidos, Jamaica y Nueva Guinea (Morris et al. 1979; Mello, 2003), *Solanum esuriale* en Australia (Mello, 2003), *Stenotaphrum secundatum* en Jamaica (Arnold & Finchman, 1950, 1997) y *Solanum stuckertii* en Argentina (Iglesias et al. 2008; Rossanigo et al. 2020). Existen también algunos reportes de calcinosis enzoótica en los que la especie botánica involucrada no pudo ser determinada (Tokarnia et al. 2000; Mello, 2003; Guedes et al. 2011).

Bovinos, ovinos y caprinos son las principales especies afectadas en los brotes de intoxicación espontánea por plantas calcinogénicas, siendo una enfermedad poco frecuente en monogástricos (Mello, 2003). Sin embargo, existen reportes de brotes en equinos (Arnold & Finchman, 1950, 1997; Krook et al. 1975; Odriozola et al. 2018) y suinos (Campero & Odriozola, 1990).

Estas plantas deben sus propiedades calcinogénicas principalmente al contenido de formas hidroxiladas de vitamina D₃: calcitriol (1,25(OH)₂D₃) y calcifediol (25(OH)₂D₃); los cuales pueden estar presentes en forma libre o en forma de glucósidos (Wasserman et al. 1976; Rambeck et al. 1979; Prema & Raghuramulu, 1994; Mello & Habermehl, 1995; Boland et al. 2003; Mello, 2003).

El contenido de estos compuestos ha sido demostrado directamente mediante técnicas cromatográficas y/o inmunoensayos en *Solanum glaucophyllum*, *Cestrum diurnum*, *Trisetum flavescens*, *Nicotiana glauca* y *S. elaeagnifolium* (Haussler et al. 1976; Wasserman et al. 1976; Rambeck et al. 1979; Prema & Raghuramulu, 1994; Boland et al. 2003). A su vez, diversos autores han demostrado que los extractos de *S. glaucophyllum*, *C. diurnum*, *T. flavescens* y *Nierembergia riograndensis* presentan efectos similares al calcitriol mediante la realización de ensayos *in vivo* (Peterlik et al. 1976; Wasserman et al. 1976; Peterlik & Wasserman, 1978; Riet-Correa et al. 1987; Mello & Habermehl, 1995).

La ingestión de estas plantas por los animales genera una diversidad de efectos patogénicos. El exceso de vitamina D y sus derivados estimula la absorción intestinal de calcio y fósforo (provocando hipercalcemia e hiperfosfatemia), inhibe la excreción renal

de calcio, e induce la diferenciación celular y la síntesis de matriz calcificable en los huesos generando osteopetrosis (Mello, 2003). Paralelamente, los principios activos de estas plantas se unen a los receptores de las células musculares lisas vasculares que, promoviendo la expresión de genes desconocidos, inducen la metaplasia osteocondral de los vasos sanguíneos y la mineralización de la túnica media de las arterias (Vasconcelos et al. 1998; Machado et al. 2022). La calcificación de los tejidos blandos genera un cuadro crónico de emaciación caracterizado por pérdida progresiva de peso y estado corporal, depresión, disnea, arqueamiento de la espalda, atrofia muscular de miembros posteriores, marcha rígida y dolorosa (Tokarnia et al. 2000; Mello, 2003; Rissi et al. 2009; Schild et al. 2021). La hipercalcemia crónica que presentan los animales intoxicados se ha visto asociada al hallazgo de lesiones neoplásicas en la tiroides (Machado et al. 2020b). La muerte sobreviene a causa de insuficiencia cardíaca y respiratoria, principalmente cuando los animales son sometidos a situaciones de estrés por ejercicio (Tokarnia et al. 2000; Mello, 2003; Rissi et al. 2009; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021).

Las pérdidas económicas asociadas a calcinosis enzoótica se encuentran relacionadas a la enfermedad (pérdida de peso, baja tasa de conversión, disminución de los índices reproductivos, pérdida del valor de la carcasa, tiempo de sobre pastoreo, descarte prematuro de los animales, aumento en la susceptibilidad a otras enfermedades, costos de tratamientos), y a la mortalidad de los animales intoxicados (Tokarnia et al. 2000; Mello, 2003; Schild et al. 2021; UNIRADD, 2023).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Las especies calcinogénicas de *Nierembergia* determinan importantes pérdidas económicas en Uruguay y Brasil.

En Uruguay existen registros de 17 brotes de calcinosis enzoótica asociados a la intoxicación por *Nierembergia*, ocurridos en 12 establecimientos localizados en los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Durazno y Rocha (Cuadro IV). La principal especie afectada fue la ovina, aunque existen tres reportes de calcinosis enzoótica por *N. rivularis* en bovinos (Machado et al. 2020; Schild et al. 2021; UNIRADD, 2023).

Los establecimientos perjudicados variaron en el tipo de explotación: desde pequeños productores de ovinos y bovinos para producción de carne, hasta importantes cabañas de Merino Australiano. La variación en su extensión fue entre 6 y 1550 ha y el tamaño del rodeo entre 40 y 2280 animales (Mederos et al. 1991; García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021; UNIRADD, 2023).

Los pequeños establecimientos donde *Nierembergia* es ubicua en toda su extensión presentaron mayores registros de morbilidad y mortalidad (Cuadro IV), fundamentalmente porque la imposibilidad de derivar el pastoreo a zonas seguras determinó la exposición permanente de los animales a la planta. En los establecimientos de gran extensión donde la planta crece únicamente en algunos sectores, la población en riesgo fue la que pastoreaba las áreas problema, comportándose en estos casos como una enfermedad “de potrero” (Mederos et al. 1991; García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021; UNIRADD, 2023).

Los ovinos desarrollaron una enfermedad crónica y estacional caracterizada por pérdida de peso y desmejoramiento progresivo de estado corporal, emaciación, depresión, marcha rígida e intolerancia al ejercicio. Los primeros síntomas se observaron en primavera (setiembre/octubre), se extendieron durante el verano, para finalizar en los meses de marzo y abril. La mortalidad se produjo entre uno y dos meses después de comenzado el cuadro. Un hallazgo común en varios brotes fue la muerte de los animales durante el arreo o situaciones de estrés (ej. manejos sanitarios). La morbilidad reportada varió entre 1,9% y 47,6%, mientras que la mortalidad osciló entre 1,1% y 37,5% (Mederos et al. 1991; García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021; UNIRADD, 2023).

El cuadro clínico en bovinos fue similar, no registrándose mortalidad de manera espontánea. La productividad se vio afectada por la disminución de los parámetros reproductivos (bajos porcentajes de preñez) y el descarte prematuro de animales intoxicados por bajo peso corporal (Schild et al. 2021; UNIRADD, 2023).

Varios de estos autores asociaron la ocurrencia de los brotes de calcinosis enzoótica a períodos de sequía que determinaron variaciones en el tapiz vegetal del campo natural que favorecieron la proliferación de *Nierembergia* (Mederos et al. 1991; García y Santos et al. 2012). A su vez, se relacionó la marcada estacionalidad de la enfermedad al ciclo fenológico de *Nierembergia rivularis*, describiéndola como una especie anual que crece entre los meses de octubre y marzo (García y Santos et al. 2012).

Cuadro IV. Brotes de intoxicación por *Nierembergia* Ruiz y Pav. reportados en Uruguay, discriminados por establecimiento.

| Localización del Establecimiento | Características del predio | Brotes (período reportado) | Especie (categoría) | Morbilidad (E/T) | Mortalidad (M/T) | Referencias |
|----------------------------------|---|----------------------------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------------------------|
| Sauce de Batoví (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Oct. 1989 - Feb. 1990 | Ovinos (capones) | 25% (50/200) | 6% (12/200) | Mederos et al. 1991 – UNIRADD |
| Sauce de Batoví (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Nov. 1989 | Ovinos (capones) | S/D | S/D | Mederos et al. 1991 – UNIRADD, 2023 |
| Quebracho (Rocha) | Campo anegable | Enero 2006 - Marzo 2006 | Ovinos (ovejas) | 37,5% (15/40) | 37,5% (15/40) | UNIRADD, 2023 |
| | | Nov. 2012 - Mayo 2013 | Ovinos (ovejas, borreg.) | 12% (6/50) | 12% (6/50) | Dutra, 2013 |
| Bañado Grande (Rivera) | Campo anegable | Dic. 2005 - Feb. 2006 | Ovinos (var. cat.) | 10% (20/200) | 6% (12/200) | García y Santos et al. 2012 |
| | | Feb. 2008 | Ovinos (ovejas) | 2,6% (5/190) | 2,6% (5/190) | UNIRADD, 2023 |
| Rincón del Bonete (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Oct. 2012 - Marzo 2013 | Ovinos (ovejas) | 5% (10/199) | 5% (10/199) | Preliasco et al. 2014 |
| Cardozo (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Oct. 2012 - Marzo 2013 | Ovinos (ovejas) | 7,5% (30/400) | 7,5% (30/400) | Preliasco et al. 2014 |
| Costas del Lago (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Set. 2012 - Marzo 2013 | Ovinos (ovejas) | 1,9% (15/755) | 1,9% (15/755) | UNIRADD, 2023 |
| Costas del Lago (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Nov. 2012 - Marzo 2013 | Ovinos (ovejas) | 6,6% (8/120) | 6,6% (8/120) | UNIRADD, 2023 |
| | | Abril 2021 | Ovinos (ovejas) | 47,6% (40/84) | 1,1% (1/84) | UNIRADD, 2023 |
| Isla Amespil Grande (Durazno) | Isla sobre lago de represa hidroeléctrica | Dic. 2012 - Abril 2013 | Ovinos (ovejas) | 24% (60/250) | 24% (60/250) | Preliasco et al. 2014 |
| | | Feb. 2016 | Ovinos (ovejas) | 10% (11/110) | 7,2% (8/110) | Machado et al. 2020 |
| Cardozo (Tacuarembó) | Campos sobre costas | Nov. 2012 - Feb 2013 | Ovinos (capones) | 24% (60/250) | 0 | UNIRADD, 2023 |
| | | Ene 2018 - Julio 2018 | Bovinos (vacas) | 3,3% (1/30) | 3,3% (1/30) | UNIRADD, 2023 |

| | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------------|----------------------------|---|---|--|------------------------|
| Cardozo (Tacuarembó) | Campo sobre costas | Set. 2017 - Feb. 2018 | Ovinos (var. cat.) Bovinos (vacas) | Ovinos: 9% (20/220) Bovinos: 5,7% (4/70) | Ovinos: 3,1% (7/220) Bovinos: 0 | Machado et al. 2020 |
| Sauce de Batoví (Tacuarembó) | Campo anegable | Enero 2019 - Junio 2021 | Bovinos (vacas, vaqu.) | 22,7%* | Descarte por CE: 26,5% | Schild et al. 2021 |

*E = Enfermos; T = Total de animales en riesgo (animales expuestos a la planta; no necesariamente el total de los animales del rodeo); M = Muertos; Oct. = Octubre; Feb. = Febrero; Nov. = Noviembre; Dic. = Diciembre; Set. = Setiembre; borreg. = borregas; var. cat. = varias categorías; vaqu. = vaquillonas; S/D = Sin Datos; CE = Calcinosis Enzoótica; UNIRADD = Unidad de Registros de Diagnósticos (Base de Datos de DILAVE, MGAP). *Promedio de la morbilidad registrada en cada uno de los tres periodos estudiados (rango de morbilidad: 9% - 34%).*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha expuesto anteriormente, la clasificación taxonómica del género *Nierembergia* Ruiz y Pavón ha requerido de varias revisiones a lo largo de la historia. Numerosos autores han incluido dentro de *Nierembergia* a especímenes pertenecientes a otros géneros con los que comparten algunas características morfológicas (ej. *Bouchetia*, *Petunia*, *Leptoglossis*, *Browallia* y *Nicotiana*) (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1995b). A su vez, el importante polimorfismo que presentan algunas especies (particularmente *N. linariifolia* Graham) ha llevado a la sobre-clasificación botánica, adjudicando nuevos nombres a especies ya descritas (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1995b). En otras oportunidades la similitud morfológica de algunas especies de *Nierembergia* ha promovido errores en la identificación taxonómica dentro del género como el caso de *N. riograndensis*, clasificada erróneamente como *N. veitchii* Hook. en Brasil (Vignoli-Silva & Mentz, 2006).

En Uruguay existen reportes de calcinosis enzoótica asociados a la intoxicación por *Nierembergia repens* (Mederos et al. 1991; Preliasco et al. 2014), *N. rivularis* (García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021) y *N. veitchii* (Dutra, 2013).

El hecho de que Millán (1941) clasificara erróneamente a *Nierembergia repens* y *N. rivularis* como especies sinónimas, y que *N. veitchii* haya sido excluida recientemente de la flora nativa de Brasil (Vignoli-Silva & Mentz, 2006, 2020) permiten considerar la posibilidad de que existan errores en la clasificación taxonómica de las especies reportadas en los brotes de calcinosis enzoótica en Uruguay. Es importante corroborar que dichas especies se encuentren adecuadamente identificadas, en línea con la clasificación taxonómica vigente. Comunicar cuáles son las especies de *Nierembergia* descritas en el territorio nacional puede contribuir para evitar confusiones en futuras investigaciones.

Nierembergia rivularis Miers es un agente etiológico de brotes de calcinosis enzoótica en ovinos y bovinos en Uruguay (García y Santos et al. 2012; Machado et al. 2020; Schild et al. 2021). Es una hierba nativa de pequeño tamaño, que generalmente se encuentra creciendo sobre costas ribereñas y terrenos anegables (Cocucci & Hunziker, 1995b).

El desarrollo de estrategias para el control de esta planta se ha visto limitado por la falta de información acerca de sus características morfológicas y fisiológicas. Existe, por ejemplo, información contradictoria sobre su ciclo fenológico. Algunos autores la caracterizan como una especie anual, presente en el campo durante la primavera y verano (época de brotes de calcinosis enzoótica) (García y Santos et al. 2012). Otros autores en cambio, la describen como una planta perenne (Millán, 1941; Vignoli-Silva & Mentz, 2020). Además, no existe información acerca de la distribución de la masa de estas plantas, las características del suelo donde crece y sus patrones de crecimiento.

La información recabada de los diversos reportes de intoxicación por *Nierembergia rivularis* lleva a considerar la existencia de un “efecto año”, donde las condiciones medioambientales favorecen la ocurrencia de brotes de calcinosis enzoótica. Sin

embargo, no existe información sobre el agente que permita explicar estas variaciones, predecir la ocurrencia de nuevos brotes e implementar estrategias de prevención y control.

La toxicidad de *Nierembergia rivularis* fue comprobada experimentalmente en ovinos (García y Santos et al. 2012) y bovinos (Schild et al. 2021). Si bien se presume que sus principios activos son derivados de la vitamina D similares a los hallados en otras plantas calcinogénicas como *Solanum glaucophyllum* (Haussler et al. 1976; Wasserman et al. 1976) y *Nicotiana glauca* (Skliar et al. 2000), hasta el momento no existe un estudio que confirme esta teoría.

La escasa información disponible sobre *Nierembergia rivularis* y las condiciones bajo las cuales se producen los brotes de calcinosis enzoótica en Uruguay motivaron el desarrollo de este estudio descriptivo.

HIPÓTESIS

Nierembergia rivularis Miers sería la especie involucrada en los brotes de calcinosis enzoótica por *Nierembergia* reportados en Uruguay, atribuyéndose su toxicidad a la capacidad de acumular principios activos derivados de la vitamina D.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Recabar información sobre el género *Nierembergia* Ruiz y Pav. en Uruguay.
- Generar información acerca de la especie *Nierembergia rivularis* Miers.

Objetivos Específicos

- Determinar qué especies del género *Nierembergia* se encuentran registradas en Uruguay y cuál es su distribución por departamento.
- Caracterizar la morfología y fenología de *Nierembergia rivularis*.
- Confirmar la presencia de metabolitos activos de la vitamina D en *Nierembergia rivularis* asociados al posible efecto calcinogénico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Relevamiento de información sobre el género *Nierembergia* Ruiz y Pav. en Uruguay

Se realizó una revisión bibliográfica con el fin de recabar información sobre las especies de *Nierembergia* presentes en Uruguay y su distribución en el país. Se consultaron descripciones originales de las especies, trabajos taxonómicos y revisiones, teniendo en cuenta la sinonimia y clasificación propuesta por Cocucci & Hunziker (1993, 1995, 1995b); Vignoli-Silva & Mentz (2006); POWO (2023) y Zuloaga et al. (2023).

Posteriormente se consultaron las colecciones botánicas de cuatro instituciones uruguayas:

- a. Herbario del Museo Nacional de Historia Natural y Antropología (MVM) del Ministerio de Educación y Cultura (MEC). Fecha de consulta: 09/08/2023.
- b. Herbario del Jardín Botánico “Profesor Atilio Lombardo” (MVJB) de la Intendencia Municipal de Montevideo (IMM). Fecha de consulta: 14/08/23.
- c. Herbario “Ing. Agr. Bernardo Rosengurt” de la Facultad de Agronomía (MVFA) de la Universidad de la República (UDELAR). Fecha de consulta: 24/08/23.
- d. Herbario de la Facultad de Química y Farmacia (MVFQ) de la UDELAR. Fecha de consulta: 20/10/23.

Se accedió a las colecciones del género *Nierembergia* de cada herbario y se registró la información sobre las especies reportadas y los departamentos donde fueron localizadas.

Confirmación taxonómica de *Nierembergia* a nivel especie en establecimientos foco de calcinosis enzoótica en ovinos y bovinos

Se concurrió a todos los establecimientos donde fueron reportados brotes de calcinosis enzoótica por intoxicación con *Nierembergia* en Uruguay (localidades de Bañado Grande, Sauce de Batoví, Cardozo, Rincón del Bonete, Costas del Lago, Isla Amespil Grande y Quebracho) (Cuadro IV). Se documentaron las características del terreno donde se encontraron comunidades de *Nierembergia* (topografía y anegamiento, relación con fuentes de agua y exposición a la luz solar/sombra), y se tomaron panes de suelo con ejemplares de *Nierembergia* para su clasificación taxonómica en el Herbario MVFA. Para facilitar el reconocimiento de las plantas las visitas se realizaron durante los meses de primavera y verano, de modo que coincidiera con la época de floración.

Selección de los sitios de muestreo para el estudio de *Nierembergia rivularis*

Con la finalidad de realizar estudios descriptivos sobre la biología y morfología de *Nierembergia rivularis*, se seleccionaron tres establecimientos (A, B y C) donde se observaron comunidades de esta especie en primavera (la evaluación se realizó en octubre de 2020). Los criterios utilizados para la selección de los mismos estuvieron relacionados con la accesibilidad (establecimientos cuyo acceso no se viera impedido en ninguna época del año, particularmente en caso de altas precipitaciones), diversidad en su topografía y fuente principal de agua (Cuadro V).

En cada predio se establecieron sitios de muestreo específicos que difirieron entre ellos en su topografía, abundancia de *Nierembergia rivularis* y demás especies vegetales con las que convive. La presencia de *N. rivularis* fue clasificada en baja (<10%), media (10 a 30%) o alta (>30%) según el área de cobertura aérea que fue evaluado al momento de la selección de los sitios (octubre de 2020) siguiendo la metodología establecida por Braun-Blanquet (1950). Los sitios de muestreo fueron seleccionados por la heterogeneidad de dichos factores de modo de incluir la mayor diversidad de ambientes en los que *N. rivularis* es capaz de crecer. Las características de estos sitios de muestreo aparecen descritas en el Cuadro V.

Cuadro V. Características de los sitios seleccionados para estudios de *Nierembergia rivularis*.

| Establecimiento | Localidad | Localización geográfica | Foco de CE | Características | Sitio de muestreo | Topografía | Presencia de <i>N. rivularis</i> |
|-----------------|-------------------|--------------------------|------------|--|-------------------|---|----------------------------------|
| A | Costas del lago | S32.44550° W56.25070° | Sí | Campo natural. A orillas del lago de represa. | A1 | Depresión en el terreno. Zona húmeda. | Alta |
| | | | | | A2 | Elevación en el terreno. Zona seca. | Baja |
| B | Rincón del Bonete | S32.48210° W56.25180° | Sí | Campo natural mejorado. Sin costa. | B | Depresión en el terreno. Zona húmeda. | Media |
| C | Paso de los Toros | S32.48120° W56.30210° | No | Campo natural. Anegable. Sobre arroyo afluente al Río Negro. | C1 | Elevación en el terreno (montículo). Zona seca. | Baja |
| | | | | | C2 | Zona intermedia. | Baja |
| | | | | | C3 | Depresión del terreno. Zona húmeda. | Media |

ID = Identificación del predio / zona muestreada. CE = Calcinosis enzoótica.

Estudios sobre la morfología de *Nierembergia rivularis*.

Para caracterizar la morfología de *Nierembergia rivularis*, se seleccionó el predio A donde se constataba la presencia de la planta en dos situaciones topográficas distintas: A1: depresión en el terreno, zona húmeda, y A2: elevación en el terreno, zona seca.

Se realizaron muestreos mensuales de los sitios A1 y A2 por un período de 12 meses (n=24). De cada zona se tomaron al azar muestras de panes de tierra de 25 cm² y 20 cm de profundidad, de modo de asegurar el muestreo de la totalidad de las estructuras de *Nierembergia rivularis* (aéreas y subterráneas). Para medir el perímetro se empleó un cuadro de hierro de 25 cm de lado, y la profundidad se midió con una regla. Se emplearon herramientas de jardinería para la extracción de la muestra (guantes, cuchilla y pala). Las muestras fueron identificadas y colocadas en recipientes de plástico individuales para su transporte.

El procesamiento de las muestras consistió en la remoción de la tierra, minerales y material vegetal seco, para lo que se emplearon tamices de acero inoxidable (VWR, N° 18, serie 18SS8F344973), contenedores de plástico y abundante agua. Este procedimiento fue llevado a cabo en el Laboratorio de Toxicología de DILAVE. Una vez obtenido el material vegetal de cada pan de tierra muestreado, se separaron las plantas de *Nierembergia rivularis* de las demás especies botánicas para su estudio.

De cada muestra analizada se seleccionaron al azar un total de diez segmentos de *Nierembergia rivularis* que incluyeran la totalidad de las estructuras de la planta (aéreas y subterráneas) (n = 240). Se estudió y describió la morfología de las plantas seleccionadas de acuerdo a la bibliografía de referencia (Braun-Blanquet 1950; Torres, 1966; Cocucci & Hunziker 1993, 1995, 1995b) y se tomaron tres puntos diferentes elegidos al azar en los que se midió la distancia entre los nudos de los tallos y grosor del rizoma (720 mediciones en total). Para realizar estas mediciones se utilizó un calibre digital de acero inoxidable graduado entre 0,01 y 150 mm.

Posteriormente se separaron las partes aéreas (hojas y flores) de las fracciones subterráneas (tallos y raíces) utilizando una tijera de punta fina. Se seleccionaron al azar un total de 30 hojas de cada muestra procesada (n = 720) en las que se midieron el largo mayor y ancho mayor de las láminas foliares y el largo del pecíolo (metodología adaptada de Wang et al. 2020).

Se examinaron las flores presentes en todas las muestras (n = 28). Se cuantificó el número de pétalos en cada una y se registraron observaciones sobre su morfología y color. Se cuantificaron los sépalos presentes en el cáliz y su disposición en relación al tallo. Se midieron el largo y ancho de los pétalos, diámetro de la corola, largo del tubo de la corola y longitud del cáliz.

Utilizando la lupa estereoscópica (Nikon, modelo SMZ645, serie 1012999) y elementos de disección vegetal (aguja enmangada, pinzas y hoja de bisturí) se realizaron cortes longitudinales al tubo de la corola para estudiar las estructuras internas de la flor (filamentos de los estambres, y ovario). Se registraron el número, forma y disposición de estambres y estigma.

Se estudiaron también las estructuras secretoras presentes en la región del limbo de la corola (tricomas), descritos en el género *Nierembergia* por Cocucci (1991).

Se realizó observación microscópica de los gránulos de polen utilizando microscopio óptico (Nikon, modelo YS100, serie 541327).

Estudios de masa y materia seca de *Nierembergia rivularis*

A partir de las muestras tomadas mensualmente de los sitios de muestreo A1 y A2 se calculó la masa total y masa relativa de *Nierembergia rivularis* y se realizaron los cálculos de materia seca (Fernández & Johnston, 1986; Melgarejo et al. 2010).

Estos sitios fueron seleccionados por representar casos extremos y opuestos sobre de la presencia de *Nierembergia rivularis* (sitio A1 = alta densidad; sitio A2 = baja densidad).

Cálculos de masa de Nierembergia rivularis

En cada una de las muestras se midió la masa del material vegetal total, la masa total de *Nierembergia rivularis* y la masa de otras especies vegetales, en base fresca en todos los casos. Con estos datos se calculó el porcentaje de masa relativa de *N. rivularis* (masa de *N. rivularis* / masa vegetal total x 100) (Fernández & Johnston, 1986; Melgarejo et al. 2010).

Además, se midió la masa de las estructuras aéreas de *Nierembergia rivularis* (hojas y flores) y la masa de su fracción subterránea (tallos y raíces). Con estos datos se calculó la relación masa subterránea / masa aérea (Fernández & Johnston, 1986; Melgarejo et al. 2010).

Para las mediciones de masa se utilizó una balanza digital portátil (SF-400C, rango entre 0,01 g y 500 g).

Estudios sobre el contenido de materia seca de Nierembergia rivularis

Las estructuras aéreas (hojas y flores) y subterráneas (tallos y raíces) de *Nierembergia rivularis* fueron acondicionadas y desecadas en estufa (Gallenkamp, mod. Hotbox-oven, serie OV-010) a 60°C hasta alcanzar su masa constante. Posteriormente se pesaron las muestras para obtener la masa seca aérea y masa seca subterránea de *N. rivularis* (Rosengurt et al. 1983). Con esta información se calculó el porcentaje de materia seca de cada una de las fracciones y la relación masa seca subterránea / masa seca aérea.

Pruebas estadísticas

Se ejecutaron pruebas estadísticas para corroborar las diferencias entre ambas zonas de muestreo en relación a la presencia de *Nierembergia rivularis* (sitio A1 = zona de alta densidad de *N. rivularis* y sitio A2 = zona de baja densidad de *N. rivularis*). Los datos evaluados fueron los registros de materia fresca total de *N. rivularis*, materia fresca de las demás especies botánicas y la relación materia fresca de *N. rivularis* / materia fresca total. Primero se realizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Debido a la distribución no paramétrica de los datos obtenidos en ambas poblaciones, se aplicó el test de Mann-Whitney U ($\alpha = 0,05$), en el que $H_1 = \text{Zona de Baja Densidad} < \text{Zona de Alta Densidad}$ para los parámetros “materia fresca de *N. rivularis*” y “masa de *N. rivularis* / masa total”; y $H_1 = \text{Zona de Baja Densidad} \neq \text{Zona de Alta Densidad}$ para el parámetro “masa de otras especies botánicas”. Los mismos tests fueron aplicados para la evaluar las diferencias entre los resultados de masa aérea y masa subterránea de *N. rivularis* ($H_1 = \text{Masa aérea} < \text{Masa subterránea}$).

Observaciones sobre el ciclo fenológico y la biología floral de *Nierembergia rivularis*

Para el estudio del ciclo fenológico se tomaron dos panes de tierra con presencia de *Nierembergia rivularis* del sitio A1 (zona de alta densidad de *N. rivularis*), de 25 cm² x 20 cm de profundidad. Dichas muestras fueron mantenidas durante 18 meses (marzo de 2021 a setiembre de 2022) en el Laboratorio de Toxicología de DILAVE, en recipientes de plástico con drenaje. Las muestras recibieron luz solar directa constante y fueron

regadas semanalmente. Durante ese período se observaron y registraron las variaciones fenológicas de *Nierembergia rivularis*.

Paralelamente se evaluó el ciclo fenológico de *Nierembergia rivularis* en condiciones de campo durante las visitas mensuales a los sitios de muestreo A1 y A2, durante un año. En cada visita se registraron los estadios fenológicos de las plantas.

Se realizaron visitas al sitio de muestreo D para estudiar el ciclo floral de *Nierembergia rivularis*. En dichas visitas se evaluó la evolución de la apertura de las flores de *N. rivularis* observadas durante el día y la noche. Las observaciones se realizaron a las 12:00, 17:00 y 22:00 horas de los días 20/11/21, 15/12/21 y 22/01/22.

Identificación de insectos que interactúan con las flores de Nierembergia rivularis

En cada salida de campo se procuró observar y registrar la interacción de insectos con las flores de *Nierembergia rivularis*. Los insectos encontrados fueron colectados y remitidos a las Secciones de Entomología y Etología de la Facultad de Ciencias UDELAR para su identificación taxonómica.

Caracterización de la comunidad vegetal en parches de ocurrencia de *Nierembergia rivularis* Miers

Para estudiar las comunidades botánicas en cada uno de los sitios de muestreo (Cuadro V) se establecieron al azar tres cuadrantes de 0,5 x 0,5 m. Dentro de ellos se identificaron todas las especies de plantas vasculares presentes, colectando especímenes de aquellas que requirieron del uso de estereoscopio para su correcta identificación en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Agronomía de la UDELAR.

A cada especie identificada se le asignó un valor de cobertura aérea estimado visualmente, siguiendo el método de Braun-Blanquet (1950). Del mismo modo, se registró la cobertura de materia seca y suelo desnudo. Para los resultados se consideraron las comunidades relevadas detallando aquellas especies con valores de cobertura iguales o mayores al 5% dentro de cada cuadrante.

Se realizaron observaciones sobre el desarrollo de la biomasa aérea y biomasa subterránea de *Nierembergia rivularis* en los diferentes escenarios de competencia que ofrecieron los seis sitios muestreados.

Estudio de las características físico-químicas de suelos donde crecen comunidades de *Nierembergia rivularis*

Se estudiaron las características físico-químicas del suelo de los sitios de muestreo identificados como A1, A2, B y C3. En cada uno se tomaron al azar un total de 20 submuestras de suelo (cilindros de 2,5 cm de diámetro x 30 cm de profundidad) utilizando un barreno de hierro. Los sitios C1 y C2 no fueron muestreados debido a que su textura pedregosa y compacta no permitió la toma de muestras completas representativas de 30 cm de profundidad.

Las muestras se enviaron refrigeradas al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua de INIA La Estanzuela.

En el laboratorio se homogeneizaron las muestras y se tomó el pH a cada una. Luego se caracterizaron y clasificaron según su textura para lo cual se calculó el % de arena, % de limo y % de arcilla.

Posteriormente se secaron en estufa a 40°C, se molieron con molino a martillo hasta obtener un tamaño de partícula capaz de atravesar un tamiz de 2 mm. Con la matriz obtenida se analizaron los siguientes parámetros: N, C, P extraído con solución de ácido cítrico, Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, acidez titulable, capacidad de intercambio iónico a pH 7, bases totales, porcentaje de saturación de bases.

Las técnicas, procedimientos y equipos utilizados para los análisis de suelos aparecen especificados en el Anexo II.

Identificación y cuantificación de principios activos de *Nierembergia rivularis*

Se tomaron ocho muestras de *Nierembergia rivularis* y una muestra de *Solanum glaucophyllum* (especie calcinogénica de referencia). El peso de cada muestra osciló entre los 150 g y 200 g de planta verde.

Debido a que los factores que determinan la síntesis y acumulación de los metabolitos hidroxilados de vitamina D en las plantas aún no son completamente conocidos (Jäpelt & Jakobsen, 2013), el criterio de selección de las muestras fue la heterogeneidad. De este modo se buscó analizar diferentes partes anatómicas de *Nierembergia rivularis*, de distintos lugares donde crece, en ubicaciones con y sin registro de calcinosis enzoótica, de modo ampliar las posibilidades de encontrar estos compuestos. Los detalles sobre el muestreo aparecen descriptos en el Cuadro VI.

Las muestras fueron pesadas, identificadas y remitidas al Laboratorio de Agroalimentos de INIA Las Brujas donde fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

En el laboratorio las muestras fueron sometidas a procedimientos de acondicionamiento, extracción y cuantificación de vitamina D₃ y sus derivados hidroxilados mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) (Koshy, 1980; Sequeira et al. 2022).

Los compuestos separados por UHPLC fueron tentativamente identificados de acuerdo a comparación con estándares certificados por sus espectros UV y sus tiempos de retención en la columna cromatográfica. Se estimó la concentración de derivados hidroxilados totales de vitamina D utilizando la curva de calibración de calcitriol. Los materiales y procedimientos utilizados aparecen detallados en el Anexo III.

Cuadro VI. Muestreo de plantas para cuantificación de vitamina D y sus derivados hidroxilados.

| N° | Especie | Muestra | Fecha | Departamento | Localidad | Georreferencia | Sitio de muestreo | Brote CE |
|----|-------------------------------|-----------------|----------|--------------|-------------------|--------------------------|-------------------|----------|
| 1 | <i>Solanum glaucophyllum</i> | Hojas | 10/08/22 | Montevideo | Santiago Vázquez | S34.79184° W56.33277° | No | No |
| 2 | <i>Nierembergia rivularis</i> | Hojas | 26/08/22 | Tacuarembó | Sauce de Batoví | S31.94273° W55.93152° | No | Sí |
| 3 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | 28/08/22 | Tacuarembó | Costas del lago | S32.75014° W56.41787° | A1 | Sí |
| 4 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | 01/11/22 | Tacuarembó | Costas del lago | S32.75014° W56.41787° | A1 | Sí |
| 5 | <i>N. rivularis</i> | Tallos y raíces | 01/11/22 | Tacuarembó | Costas del lago | S32.75014° W56.41787° | A1 | Sí |
| 6 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | 04/11/22 | Tacuarembó | Paso de los Toros | S32.80563° W56.50320° | C3 | No |
| 7 | <i>N. rivularis</i> | Flores | 04/11/22 | Tacuarembó | Paso de los Toros | S32.80563° W56.50320° | C3 | No |
| 8 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | 04/11/22 | Tacuarembó | Rincón del bonete | S32.80642° W56.42154° | B | Sí |
| 9 | <i>N. rivularis</i> | Flores | 04/11/22 | Tacuarembó | Rincón del bonete | S32.80642° W56.42154° | B | Sí |

CE = Calcinosis enzoótica.

RESULTADOS

Relevamiento de información sobre el género *Nierembergia* Ruiz y Pav. en Uruguay

De acuerdo con la información recabada de la bibliografía y los herbarios consultados, en Uruguay existen nueve especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav. distribuídas heterogéneamente en el territorio nacional (Cuadros VII y VIII).

Según estos registros, las especies con mayor distribución en el territorio nacional son *Nierembergia scoparia* Sendtn. y *Nierembergia calycina* Hook.

Cuadro VII. Especies de *Nierembergia* y su distribución departamental en Uruguay reportados en la bibliografía.

| Especie de <i>Nierembergia</i> | Departamento |
|---|---|
| <i>N. aristata</i> D.Don | Florida ^{b,g} , S/D ^{d,f} |
| <i>N. calycina</i> Hook. | Canelones ^{a,g} , Colonia ^g , Flores ^{a,g} , Soriano ^{a,g} , S/D ^{d,f} |
| <i>N. ericoides</i> Miers | Canelones ^a , Maldonado ^a , Soriano ^a , S/D ^g |
| <i>N. graveolens</i> A.St.-Hil. | Cerro Largo ^{a,g} , Colonia ^a , Soriano ^{a,g} , S/D ^{d,f} |
| <i>N. linariifolia</i> Graham var. <i>linariifolia</i> * | Montevideo ^{a,c,c,g} , Paysandú ^{a,c,g} , San José ^c , S/D ^f |
| <i>N. micrantha</i> Cabrera | Artigas ^g , Rivera ^g , Treinta y Tres ^g , S/D ^f |
| <i>N. pinifolia</i> Miers | Artigas ^g , Cerro Largo ^a , Lavalleja ^g , Maldonado ^{a,g} , S/D ^f |
| <i>N. rivularis</i> Miers | Colonia ^{a,g} , Soriano ^g , S/D ^{d,f} |
| <i>N. scoparia</i> Sendtn. | Canelones ^{a,g} , Cerro Largo ^{a,g} , Colonia ^{a,g} , Florida ^g , Montevideo ^g , Rivera ^{a,c,g} , San José ^{a,g} , Soriano ^{a,c,g} , Tacuarembó ^{a,g} , S/D ^{a,d,f} |

var. = variedad. Referencias: a: Millán (1941); b: Cocucci & Hunziker (1993); c: Cocucci & Hunziker (1995); d: Cocucci & Hunziker (1995b); e: Vignoli-Silva & Mentz (2006); f: POWO (2023); g: Zuloaga et al. (2023); S/D: especie reportada sin información disponible sobre su distribución departamental. *Se incluyeron las variedades *Nierembergia gracilis* Hook. var. *guaranitica* y *N. scoparia* Sendtn. var. *glaberrina* reportadas por Millán (1941). Éstas fueron re clasificadas por Cocucci & Hunziker (1995, 1995b) como sinónimos de *N. linariifolia* Graham var. *linariifolia*.

Cuadro VIII. Registros en herbarios de las especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav y su distribución departamental en Uruguay.

| Especie de <i>Nierembergia</i> | Departamento |
|---------------------------------|---|
| <i>N. aristata</i> D.Don | Canelones ^b , Florida ^{a,c} , Paysandú ^c , Salto ^c |
| <i>N. calycina</i> Hook. | Canelones ^c , Colonia ^c , Durazno ^{b,c} , Flores ^c , Florida ^b , Montevideo ^{b,c} , Paysandú ^{b,c} , Río Negro ^{b,c} , Rivera ^{b,c} , Salto ^c , Soriano ^{b,c} , Tacuarembó ^{b,c} , S/D ^{a,d} |
| <i>N. ericoides</i> Miers | Canelones ^c , Lavalleja ^c , Maldonado ^{b,c,d} |
| <i>N. graveolens</i> A.St.-Hil. | Cerro Largo ^a , Maldonado ^b , Paysandú ^c , Río Negro ^c , Soriano ^c |
| <i>N. linariifolia</i> Graham | Artigas ^c , Canelones ^d , Cerro Largo ^c , Paysandú ^{b,c} , Río Negro ^{b,c,d} , Rivera ^d , Salto ^c , Treinta y Tres ^{b,c} |
| <i>N. micrantha</i> Cabrera | Artigas ^c , Rivera ^{b,c} , Tacuarembó ^b , Treinta y Tres ^c |
| <i>N. pinifolia</i> Miers | Artigas ^c , Cerro Largo ^c , Lavalleja ^c , Maldonado ^c , S/D ^a |
| <i>N. rivularis</i> Miers | Colonia ^{a,c} , Durazno ^b , Río Negro ^{b,c} , Rocha ^{c,d} , Rivera ^d , Soriano ^{a,c,d} , Tacuarembó ^{a,b,c} |
| <i>N. scoparia</i> Sendtn. | Artigas ^{b,c} , Canelones ^b , Cerro Largo ^c , Colonia ^{b,c} , Durazno ^b , Florida ^{b,c} , Lavalleja ^c , Maldonado ^c , Paysandú ^c , Río Negro ^{b,c} , Rivera ^{b,c,d} , Salto ^c , San José ^{c,d} , Soriano ^c , Tacuarembó ^{b,c} , S/D ^a |

Referencias: a: Herbario del Museo Historia Natural, MEC; b: Herbario del Jardín Botánico de Montevideo, IMM; c: Herbario de Facultad de Agronomía, UDELAR; d: Herbario de Facultad de Química y Farmacia, UDELAR; S/D: presencia de ejemplar en Herbario sin información sobre departamento.

Confirmación taxonómica de *Nierembergia* a nivel especie en establecimientos foco de calcinosis enzoótica

Las muestras de plantas recolectadas en los establecimientos donde se reportaron brotes de calcinosis enzoótica en ovinos y bovinos, localizados en los departamentos de Rivera (Bañado Grande), Tacuarembó (Cardozo, Sauce de Batoví, Rincón del Bonete, Costas del Lago), Durazno (Isla Amespil Grande) y Rocha (Quebracho), fueron clasificadas taxonómicamente como *Nierembergia rivularis* Miers en todos los casos. No se encontraron ejemplares de otras especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav., ni de plantas calcinogénicas pertenecientes a otros géneros botánicos en los establecimientos visitados.

Los lugares donde se encontró la planta compartían la particularidad de encontrarse sobre el margen de una gran fuente de agua (ej. arroyo Batoví, lago de la Represa Rincón del Bonete), o en una depresión del terreno anegable ante la ocurrencia de precipitaciones; recibiendo siempre luz solar de forma directa (lugares despejados, sin monte).

Estudios sobre la morfología de *Nierembergia rivularis*

En las visitas mensuales realizadas en las zonas de muestreo de *Nierembergia rivularis* se registró información acerca de la morfología y fenología de esta especie.

Se encontró que los tallos de *Nierembergia rivularis* son subterráneos, presentándose en forma de rizomas. Los mismos poseen una superficie lisa, varían en su grosor (entre 0,9 y 2,6 mm) y color (violeta, blanco y marrón). Pueden ser simples, rectos y alargados, o presentar numerosos rizomas laterales que emergen de las yemas y que le confieren una forma reticulada compleja (Fig. 5 y 6). De las yemas emergen una o varias hojas (se observaron hasta cuatro) de manera alternada, pedicelos florales y raíces adventicias (en sentido contrario a las hojas) de apariencia rizada, que varían en su grosor (entre 0,5 y 1,5 mm) y color (blanco y marrón).

Los resultados sobre las mediciones realizadas en los rizomas de *Nierembergia rivularis* aparecen resumidos en el Cuadro IX.

Cuadro IX. Morfometría de los rizomas de *Nierembergia rivularis* Miers.

| Distancia entre nudos (mm) * | | | Grosor del rizoma (mm) * | | |
|------------------------------|-------|-----|--------------------------|-------|-----|
| (n = 240) | | | (n = 240) | | |
| Rango | Media | DS | Rango | Media | DS |
| 2,0 - 34,2 | 12,6 | 5,5 | 0,9 - 2,6 | 1,8 | 3,2 |

DS = Desviación Standard. *Resultados de 720 mediciones realizadas sobre 240 segmentos de *N. rivularis*.

Se observó que las hojas de *Nierembergia rivularis* son simples, pecioladas, glabras, con márgenes lisos, dispuestas de manera alternada en el tallo, aunque en algunos casos se observó la emergencia de hasta 4 hojas de lo que macroscópicamente aparentaba ser la misma yema (Fig. 5 y 6).

Se encontró al pecíolo de las hojas emergiendo directamente desde la superficie del suelo, manteniendo las hojas erguidas en posición vertical o levemente inclinadas. Su longitud fue variable entre (entre 0,3 y 9,4 cm), siendo más largos en aquellas zonas donde existía competencia con otras especies botánicas por el espacio aéreo. El color del pecíolo varió entre blanco (porción del pecíolo más próximo al rizoma), violeta y verde.

Las láminas de las hojas presentaron forma espatulado-obovada, con un ápice obtuso con tendencia a redondearse, y la base de forma atenuada. Se observó un patrón de nervaduras reticulada, de morfología pinada. El color de las láminas varió entre verde brillante y verde oscuro (Fig. 7).

La información recabada sobre las mediciones realizadas a las hojas de *Nierembergia rivularis* aparecen resumidos en el Cuadro X.

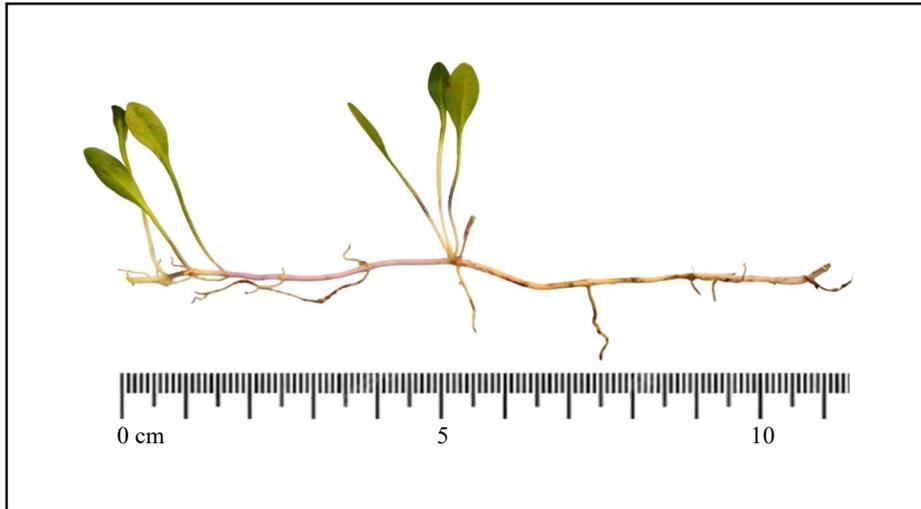


Figura 5. Morfología de *Nierembergia rivularis* Miers. (ejemplar colectado en establecimiento A el 18/07/22). Se observa un rizoma simple, recto, de coloración variable entre blanco-violáceo y marrón, con finas raíces adventicias emergiendo en sentido opuesto a las hojas. En el extremo izquierdo del tallo se observa la emergencia de tres hojas simples, mientras que en el centro se ven tres hojas que se originan juntas (probablemente desde la misma yema).

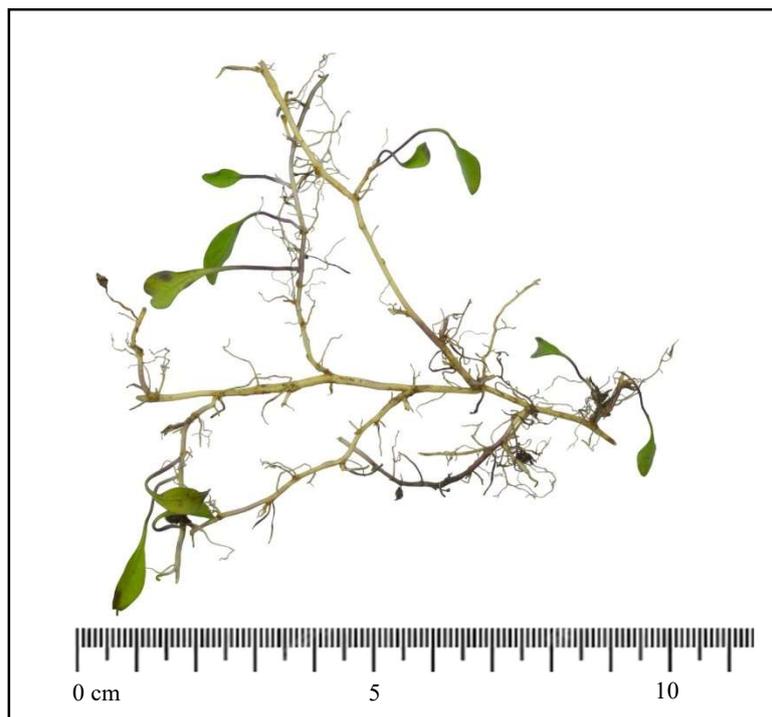


Figura 6. Rizoma de *Nierembergia rivularis* (planta colectada en establecimiento A el 20/03/21). Se observa la complejidad que adoptan los tallos subterráneos de esta especie.



Figura 7. Láminas foliares de *Nierembergia rivularis* (ejemplares colectados en establecimiento A el 11/10/21). Se observa la forma y tamaño en las diferentes etapas de crecimiento de la planta.

Cuadro X. Morfometría de las hojas de *Nierembergia rivularis* Miers.

| Lámina de la hoja (n = 720) | | | | | | Pecíolo de la hoja (n = 720) | | |
|--------------------------------|-------|-----|------------------|-------|-----|---------------------------------|-------|-----|
| Longitud (cm) | | | Ancho mayor (cm) | | | Longitud (cm) | | |
| Rango | Media | DS | Rango | Media | DS | Rango | Media | DS |
| 0,5 - 6,2 | 1,7 | 0,7 | 0,2 - 2,5 | 0,8 | 0,4 | 0,3 - 9,4 | 2,4 | 1,3 |

DS = *Desviación Standard*.

Se observó que las flores emergen de manera solitaria desde un pequeño pedicelo de 1 a 2 mm de longitud inserto en el tallo subterráneo. En algunos casos fue posible observar la emergencia de una o más hojas desde el mismo punto donde se originó la flor. El cáliz tubuloso, de bordes dentados, levemente curvado, presentó una longitud variable entre 10 y 14 mm. El tubo corolino firme y largo (entre 9 y 58 mm de longitud), se presentó erecto o levemente curvado para permitir la exposición del limbo en una posición semi paralela al suelo (Fig. 8 y 9). La corola actinomorfa e hipocrateriforme, se encontró compuesta invariablemente por cinco pétalos plegados en la flor cerrada, fusionados entre sí, de color blanco en sus dos tercios externos y amarillo en su tercio interno (zona de la garganta de la corola) desde donde emergen las piezas que conforman el androceo y el gineceo) (Fig. 10). En la cara externa de cada pétalo las flores presentaron una franja triangular central de color violeta, más notoria en las flores jóvenes.

Los datos acerca de las dimensiones de las estructuras de las flores de *Nierembergia rivularis* aparecen descritos en el Cuadro XI.



Figura 8. Planta de *Nierembergia rivularis*. Se observa la disposición del rizoma (subterráneo) en posición horizontal dando origen a los pecíolos de dos ojas y un caliz floral a partir del mismo nudo. Se aprecia su tubo corolino, largo y firme, y la forma campanulada de la corola.



Figura 9. Flor de *Nierembergia rivularis* (vista lateral) en diferentes etapas de apertura (ejemplares fotografiados en establecimiento A el 15/10/21). En las fotografías A y B pueden observarse cómo los pétalos de la flor se hallan plegados sobre sí en la flor cerrada. En las imágenes C y D se aprecia la dirección que adquiere la corola desplegada. Su forma hipocrateriforme y la rigidez del tubo corolino determinan la disposición de la corola (semi paralela al suelo), exponiendo sus estructuras reproductivas y tricomas glandulares a los insectos polinizadores.



Figura 10. Flor de *Nierembergia rivularis* (vista aérea) (ejemplares fotografiados en establecimiento A el 04/03/22). Se observan sus cinco pétalos fusionados, blancos en sus dos tercios externos y amarillos en el interior. En la imagen A se evidencia el plegamiento de los pétalos de la corola semi abierta. En la imagen B se observa con detalle la coloración y la disposición de las lacinias en la flor completamente abierta.

Cuadro XI. Morfometría de las flores de *Nierembergia rivularis* Miers.

| Dimensiones de los pétalos (n = 28) | | | | | | Tubo corolino (n = 28) | | | Cáliz de la flor (n = 28) | | |
|--|-------|-----|------------------|-------|-----|---------------------------|-------|------|------------------------------|-------|-----|
| Longitud (mm) | | | Ancho mayor (mm) | | | Longitud (mm) | | | Longitud (mm) | | |
| Rango | Media | DS | Rango | Media | DS | Rango | Media | DS | Rango | Media | DS |
| 13 - 23 | 17,1 | 2,6 | 10 - 15 | 12,4 | 1,8 | 9 - 58 | 38,3 | 16,6 | 10,9 - 16,1 | 13,5 | 2,3 |

DS = Desviación Standard.

Bajo lupa estereoscópica se observó que el ovario en esta especie es súpero (es decir, no está cubierto por el receptáculo), de color verde-amarillento y forma elíptica.

Se constató la presencia de cinco estambres fusionados a la garganta de la corola; tres de ellos son más bajos que el estigma y dos lo sobrepasan en altura.

Se observó que el estilo emerge de manera recta a la altura de la garganta de la corola, pero se curva sobre el final de su extensión, determinando esa desviación lateral descrita del estigma. El estigma de forma semilunar y color amarillo verdoso, pequeño (1,8 mm de ancho y 2,0 mm de altura), se presentó inclinado hacia uno de los bordes laterales en las flores estudiadas.

El estudio de las estructuras de la flor con lupa estereoscópica permitió la visualización de los tricomas que tapizan la superficie de los pétalos, pistilo y estambres. Los mismos se encuentran concentrados en la garganta de la corola, son capitados y de color amarillo claro (Fig. 11).

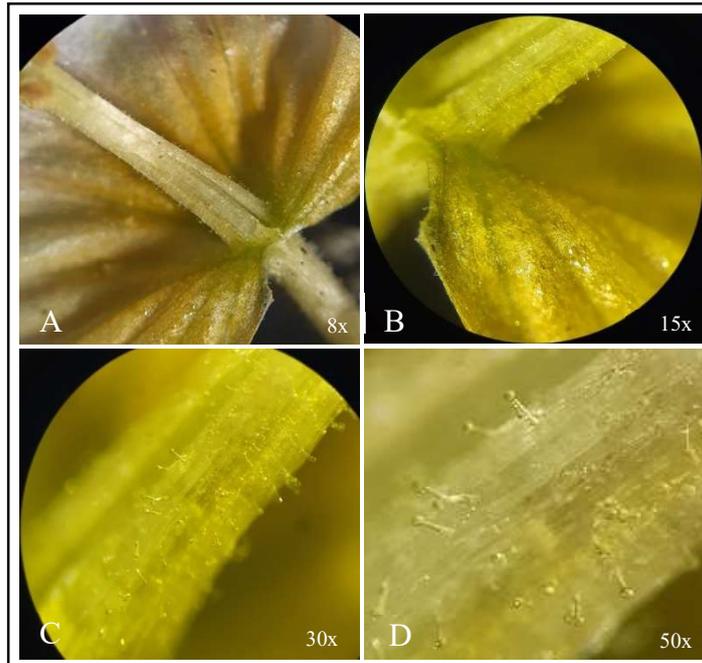


Figura 11. Flor de *Nierembergia rivularis* bajo lupa estereoscópica. A menor aumento (A y B) se observa la distribución generalizada de los tricomas tapizando la garganta de la corola y los filamentos de los estambres. A mayor aumento se observa con detalle su forma capitada (C y D).

A la observación microscópica se confirmó la disposición en tétrades de los gránulos de polen de *Nierembergia rivularis* (Fig. 12).

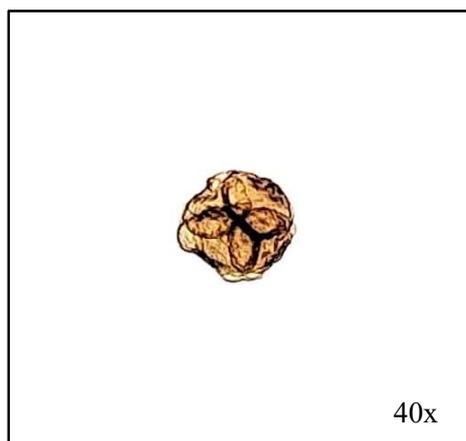


Figura 12. Gránulo de polen de *Nierembergia rivularis*. La observación microscópica permitió constatar la disposición en tétrades de los granos de polen en esta especie.

Estudios de masa y materia seca de *Nierembergia rivularis*

Cálculos de masa de *Nierembergia rivularis*

El criterio de selección de las zonas muestreadas en relación a la densidad de *Nierembergia rivularis* fue corroborado cuantitativamente por los resultados de las mediciones de la masa de la planta, la masa de las demás especies y la relación entre ambas. Los resultados aparecen resumidos en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Masa de *Nierembergia rivularis* Miers en sitios de muestreo A1 y A2 registrada en muestras de 25 cm², entre marzo de 2021 y febrero de 2022.

| | Masa de <i>Nierembergia rivularis</i> | | | Masa de otras especies botánicas | | | Relación <i>N. rivularis</i> /total | | |
|-------------|---------------------------------------|-----------|------|----------------------------------|-----------|-------|-------------------------------------|-----------|------|
| | Rango (g) | Media (g) | DS | Rango (g) | Media (g) | DS | Rango (%) | Media (%) | DS |
| A1 (n = 12) | 59,7 - 116,2 | 80,9 | 10,6 | 135,8 - 377,4 | 263,1 | 121,3 | 15,1 - 46,1 | 26,3 | 17,2 |
| A2 (n = 12) | 1,8 - 29,3 | 13,6 | 6,8 | 118,8 - 378,6 | 241,8 | 95,0 | 0,7 - 17,7 | 6,0 | 4,2 |
| P | | 0,83 % | | | 83 % | | | 0,027 % | |
| Z | | -2,4 | | | 0,2 | | | -3,4 | |

DS = Desviación Standard.

Los resultados obtenidos señalan que *Nierembergia rivularis* posee una distribución desigual de su masa en favor de sus estructuras subterráneas (tallos y raíces adventicias). Estas diferencias fueron más evidentes cuando se midieron en materia seca. Los resultados obtenidos aparecen ilustrados en el Cuadro XIII.

Cuadro XIII. Masa de las partes aéreas y subterráneas de *Nierembergia rivularis* registrada en muestras de 25 cm².

| | Masa aérea | Masa subterránea | Relación MSubt/MA | P | z |
|-----------------------|--------------|------------------|-------------------|-------|------|
| Planta Verde (n = 24) | | | | | |
| Rango | 0,7 - 42,4 g | 1,1 - 73,8 g | 1,2 - 7,1 | 14 % | -1,0 |
| Media | 8 g | 17,7 g | 2,5 | | |
| DS | 10,4 | 20,2 | 1,4 | | |
| Planta Seca (n = 24) | | | | | |
| Rango | 0,1 - 5,7 g | 0,3 - 21,4 g | 2,4 - 15,5 | 0,8 % | -2,3 |
| Media | 1,1 g | 4,9 g | 5,1 | | |
| DS | 1,4 | 5,4 | 2,7 | | |

MSubt = Masa Subterránea; MA = Masa Aérea; DS = Desviación Standard.

Estudios sobre el contenido de materia seca de *Nierembergia rivularis*

Las partes aéreas de *Nierembergia rivularis* (hojas y flores) presentaron menor contenido de materia seca que las partes subterráneas (tallos y raíces). Los resultados obtenidos aparecen en el Cuadro XIV.

Cuadro XIV. Materia seca de *Nierembergia rivularis* registrada en muestras de 25 cm², entre marzo de 2021 y febrero de 2022.

| MS fracción aérea (n = 24) | | | MS fracción subterránea (n = 24) | | | MS total planta (n = 24) | | |
|-------------------------------|--------------|-----|-------------------------------------|--------------|-----|-----------------------------|--------------|-----|
| Rango (%) | Media (%) | DS | Rango (%) | Media (%) | DS | Rango (%) | Media (%) | DS |
| 7,6 - 22,4 | 14,0 | 3,4 | 14,9 - 56,1 | 29,2 | 8,8 | 12,9 - 41,4 | 24,5 | 6,5 |

MS = Materia Seca; DS = Desviación Standard.

Observaciones sobre el ciclo fenológico y la biología floral de *Nierembergia rivularis*

El estudio de las muestras reveló que las plantas de *Nierembergia rivularis* mantenidas en condiciones constantes de luz y humedad no presentaron un comportamiento estacional en relación a la presencia de sus hojas, las cuales no desaparecieron en ningún momento. La floración comenzó a finales del mes de octubre y se extendió hasta el mes de abril.

Este mismo comportamiento se observó en las visitas mensuales al campo, con la diferencia que las plantas se vieron afectadas en su densidad foliar durante los períodos de ausencia de precipitaciones. En este sentido se observó un importante rebrote colectivo de la comunidad de *Nierembergia rivularis* posterior a las precipitaciones, independientemente del mes del año en que ocurrieran.

En las visitas realizadas al establecimiento C para evaluar el ciclo floral de *Nierembergia rivularis* se observó que las flores permanecieron abiertas durante la noche, manteniendo la posición de la corola semi paralela al suelo. No se evidenciaron movimientos noctinásticos de las flores de *N. rivularis*.

Identificación de insectos que interactúan con las flores de *Nierembergia rivularis*

En las visitas a campo se encontraron dos insectos interactuando con las flores de *Nierembergia rivularis*.

El primero fue observado en el establecimiento A el 15/10/2021 sobre el mediodía. El ejemplar fue identificado como *Astylus quadrilineatus* (Melyridae) en la Sección de Entomología de Facultad de Ciencias, UDELAR (Fig. 13).

El segundo insecto colectado fue una abeja de la Familia Apidae, Subfamilia Apinae, Tribu *Tapinotaspidini* (Sección Etología de Facultad de Ciencias, UDELAR). Se trató de un ejemplar de pequeño tamaño (6 mm de longitud y un abdomen de 2 mm de ancho) (Fig. 14). La colecta fue realizada en el establecimiento B, en la tarde (previo al

crepúsculo) del 01/11/22, mientras el insecto se encontraba reposando inmóvil dentro de una flor de *Nierembergia rivularis*.

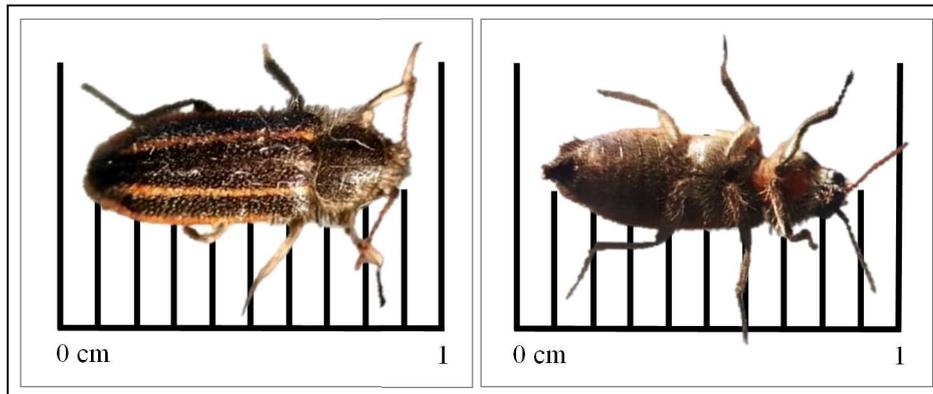


Figura 13. *Astylus quadrilineatus* (Melyridae). Ejemplar colectado de una flor de *Nierembergia rivularis*.

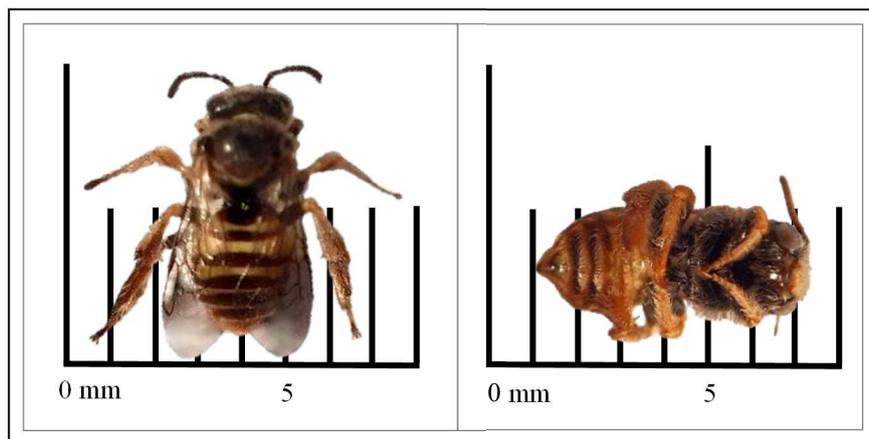


Figura 14. Abeja recolectora de aceites de la Tribu *Tapinotaspidini*. Ejemplar colectado de una flor de *Nierembergia rivularis*.

Caracterización de la comunidad vegetal en parches de ocurrencia de *Nierembergia rivularis* Miers

Se encontró un alto grado de heterogeneidad entre los seis sitios estudiados, tanto para la presencia de *Nierembergia rivularis* como de las demás especies botánicas con las que convive. Los resultados aparecen ilustrados en el Cuadro XV.

Todos los lugares donde se observó la presencia de comunidades de *Nierembergia rivularis* presentaron exposición directa a la luz solar. En las áreas donde se evidenció una mayor competencia por el espacio aéreo de otras especies botánicas (zona de muestreo A2), los pecíolos de las hojas de *N. rivularis* presentaron mayor longitud (en

relación a las hojas de la zona A1), igualando la altura de las demás especies competidoras (*Cynodon dactylon* principalmente).

En los sitios donde se registró una elevada competencia por el espacio subterráneo con otras especies vegetales se observó a los tallos y raíces adventicias de *Nierembergia rivularis* entremezclarse con los rizomas y raíces ajenas, aprovechando los espacios dentro de sus estructuras para crecer. Esta interacción fue particularmente manifiesta con los rizomas leñosos de *Paspalum notatum*, en la zona de muestreo C3. Coincidentemente en esta zona se observó un menor desarrollo de la biomasa aérea de *N. rivularis*, con la característica de presentar pecíolos cortos y láminas foliares pequeñas, en comparación con las demás zonas muestreadas.

Cuadro XV. Comunidades vegetales en predios con ocurrencia de *Nierembergia rivularis*.

| | | |
|---------------------------------|---|--|
| Sitio A1 | | |
| Topografía | Depresión del terreno, zona húmeda | |
| Total de especies por cuadrante | 5 a 15 | |
| Cobertura de materia seca | 5% | |
| Cobertura de suelo desnudo | 5% a 10% | |
| Principal especie presente | <i>Nierembergia rivularis</i> (50%) | |
| Otras especies | <i>Stemodia palustris</i> A. St.-Hil. (25% a 30%), <i>Steinchisma hians</i> (10%), <i>Cynodon dactylon</i> (5%) | |
| Sitio A2 | | |
| Topografía | Elevación del terreno, zona seca | |
| Total de especies por cuadrante | 5 a 15 | |
| Cobertura de materia seca | 5% | |
| Cobertura de suelo desnudo | 5% a 10% | |
| Principal especie presente | <i>Cynodon dactylon</i> (80%) | |
| Otras especies | <i>Nierembergia rivularis</i> (5%), <i>Lotus suaveolens</i> Pers. (5%) | |
| Sitio B | | |
| Topografía | Leve depresión de terreno | |
| Total de especies por cuadrante | 8 a 15 | |
| Cobertura de materia seca | 5% | |
| Cobertura de suelo desnudo | 10% | |
| Principal especie presente | <i>Nierembergia rivularis</i> (10% a 40%) | |
| Otras especies | <i>Conyza pampeana</i> (Parodi) Cabrera (20% a 30%), <i>Paspalum notatum</i> (hasta 35%), <i>Steinchisma hians</i> (0,5% a 15%), <i>Eleocharis radicans</i> (Poir.) Kunth (0,5% a 10%), <i>Cynodon dactylon</i> (1% a 5%), <i>Micropsis dasycarpa</i> (0,5% a 5%) | |
| Establecimiento C | | |
| Topografía | Suelo arcilloso con una microtopología formada por numerosos pequeños montículos con depresiones húmedas entre ellos | |
| Total de especies por cuadrante | 13 a 18 | |
| Cobertura de materia seca | 10% | |
| Cobertura de suelo desnudo | 5% | |
| Sitio C1 | | |
| Topografía | Elevación del terreno (montículo). Zona seca y pedregosa. | |
| Principal especie presente | <i>Paspalum notatum</i> Flüggé (25%) y <i>Soliva sessilis</i> Ruiz & Pav. (25%) | |
| Otras especies | <i>Adesmia bicolor</i> (Poir.) DC. (10%), <i>Agalinis communis</i> (Cham. & Schltdl.) D'Arcy (10%), <i>Nassella neesiana</i> (Trin. & Rupr.) Barkworth (5%), <i>Nierembergia rivularis</i> (1%) | |
| Sitio C2 | | |
| Topografía | Zona de elevación y humedad intermedia | |
| Principal especie presente | <i>Dichondra sericea</i> Sw. (50%) | |
| Otras especies | <i>Paspalum notatum</i> (30%), <i>Axonopus fissifolius</i> (Raddi) Kuhl. (10%), <i>Soliva sessilis</i> (5%), <i>Nierembergia rivularis</i> (1%) | |

| | | |
|----------|----------------------------|---|
| Sitio C3 | Topografía | Depresión del terreno. Zona de alta humedad. Anegable |
| | Principal especie presente | <i>Nierembergia rivularis</i> (30%) |
| | Otras especies | <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (25%), <i>Dichondra sericea</i> (15%), <i>Eryngium echinatum</i> Urb. (10%), <i>Mentha pulegium</i> L. (10%), <i>Steinchisma hians</i> (Elliott) Nash (5%) |

Estudio de las características físico-químicas de suelos donde crecen comunidades de *Nierembergia rivularis*

Los resultados sobre los análisis de suelos de las zonas relevadas aparecen descriptos en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Características físico-químicas de suelos donde existen comunidades de *Nierembergia rivularis*.

| | Sitio de muestreo | | | |
|-------------------------------|-------------------|---------|-------------------|-----------|
| | A1 | A2 | B | C3 |
| pH (H ₂ O) | 6,8 | 7,8 | 5,5 | 6,2 |
| A.Tit. (meq/100g) | 2,2 | 0 | 3,9 | 5,1 |
| CICpH ₇ (meq/100g) | 25,8 | 10,2 | 13,9 | 68,5 |
| Bases T (meq/100g) | 23,6 | 10,2 | 10,0 | 63,4 |
| Sat Bases (%) | 91,5 | 100,0 | 72,0 | 92,6 |
| C. Inorg ^a (%) | 0 | 0,03 | 0 | 0 |
| P ácido cítrico (µg P/g) | 3,2 | 6,0 | 4,6 | 27,2 |
| N total (%) | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 |
| C total (%) | 1,5 | 0,9 | 1,8 | 4,3 |
| Ca (meq/100g) | 18,9 | 8,1 | 7,0 | 48,8 |
| Mg (meq/100g) | 4,1 | 1,9 | 2,4 | 13,4 |
| K (meq/100g) | 0,33 | 0,17 | 0,58 | 0,61 |
| Na (meq/100g) | 0,22 | 0,09 | 0,09 | 0,63 |
| Cu (mg/kg) | 3,05 | 1,58 | 2,61 | 7,54 |
| Fe (mg/kg) | 75,4 | 52,3 | 171,6 | 176,4 |
| Mn (mg/kg) | 36,1 | 34,0 | 48,9 | 26,2 |
| Zn (mg/kg) | < 0,2 | < 0,2 | 0,91 | 2,29 |
| % Arena | 47 | 78 | 53 | 6 |
| % Limo | 20 | 6 | 18 | 20 |
| % Arcilla | 32 | 16 | 28 | 74 |
| Clasificación | Arenoso arcilloso | Arenoso | Arenoso arcilloso | Arcilloso |

A.Tit. = acidez titulable; CICpH₇ = capacidad de intercambio catiónico a pH 7; Bases T = bases totales; Sat Bases = saturación de bases; C. Inorg^a = Carbono inorgánico.

Identificación y cuantificación de principios activos de *Nierembergia rivularis*

Se encontraron cantidades apreciables de derivados hidroxilados de la vitamina D en la totalidad de las muestras estudiadas de *Nierembergia rivularis*. En ninguna de las muestras estudiadas se detectó la presencia de vitamina D₃. Los resultados aparecen descritos en el Cuadro XVII.

Cuadro XVII. Vitamina D y sus derivados hidroxilados en *Nierembergia rivularis*.

| Nº | Especie | Muestra | Localidad | Derivados hidroxilados de vitamina D totales (µg/g fresco) | DS (µg/g fresco) | Vitamina D ₃ (µg/g fresco) |
|---------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------|--|------------------|---------------------------------------|
| 1 | <i>Solanum glaucophyllum</i> | Hojas | Santiago Vázquez | 52,8 | 2,1 | n.d. |
| 2 | <i>Nierembergia rivularis</i> | Hojas | Sauce de Batoví | 70,5 | 1,2 | n.d. |
| 3 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | Costas del lago | 90,3 | 3,2 | n.d. |
| 4 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | Costas del lago | 100,2 | 1,9 | n.d. |
| 5 | <i>N. rivularis</i> | Tallos y raíces | Costas del lago | 176,6 | 4,6 | n.d. |
| 6 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | Paso de los Toros | 200,3 | 14,4 | n.d. |
| 7 | <i>N. rivularis</i> | Flores | Paso de los Toros | 83,8 | 0,07 | n.d. |
| 8 | <i>N. rivularis</i> | Hojas | Rincón del bonete | 116,6 | 1,7 | n.d. |
| 9 | <i>N. rivularis</i> | Flores | Rincón del bonete | 124,3 | 1,3 | n.d. |
| Límite de detección | | | | 0,13 | | 0,01 |

DS = Desviación Standard; n.d. = no detectado (resultado menor al límite de detección).

DISCUSIÓN

La información recabada de los herbarios y la bibliografía reveló que Uruguay cuenta con una amplia variedad de especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav. (nueve especies diferentes de las 21 que posee el género). Esto resulta más evidente si se lo compara con Argentina, el país que alberga la mayor diversidad de *Nierembergia* con 15 especies reportadas en su territorio (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1995, 1995b).

El género *Nierembergia* se encuentra presente en todos los departamentos de Uruguay, de manera heterogénea según la especie. La información obtenida de los herbarios y la bibliografía consultada es coincidente en las especies reportadas y complementaria en su distribución (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1993, 1995, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2006; POWO, 2023; Zuloaga et al. 2023).

Es importante destacar que las colecciones de *Nierembergia* que poseen los herbarios en Uruguay son el conjunto de ingresos realizados por investigadores de manera autónoma e independiente, lo cual permite dar una idea general (probablemente subestimada) de su presencia en el país. Para estudiar la distribución de un género botánico se requiere la revisión de todos los ejemplares herborizados y la realización de un relevamiento a nivel nacional a partir de un muestreo aleatorio y sistemático que abarque la totalidad del territorio, tal como lo han realizado otros investigadores en otras partes del continente (Vignoli-Silva & Mentz, 2006, 2020; Zuloaga et al. 2023).

Nierembergia Ruiz y Pav. no es un género ubicuo en América del Sur, sino que las diferentes especies se encuentran adaptadas a la región específica de donde son nativas y, salvo el caso de *N. linariifolia*, no tienden a dispersarse hacia otros territorios (Millán, 1941; Cocucci, 1991; Cocucci & Hunziker, 1995b; POWO, 2023; Zuloaga et al. 2023).

Nierembergia repens y *N. veitchii* fueron reportadas en focos de calcinosis enzoótica ocurridos en Uruguay (Mederos et al. 1991; Dutra, 2013; Preliasco et al. 2014). Sin embargo, en las visitas realizadas a estos establecimientos la única especie identificada fue *N. rivularis*. Adicionalmente, estas especies no se encontraron en ninguno de los cuatro herbarios consultados ni en las visitas de campo. Tampoco aparecen descritas en Uruguay en la bibliografía consultada (Millán, 1941; Cocucci & Hunziker, 1993; Cocucci & Hunziker, 1995; Cocucci & Hunziker, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2006; POWO, 2023; Zuloaga et al., 2023), por lo que es probable que hayan sido mal clasificadas.

Nierembergia repens y *N. rivularis* son dos especies morfológicamente similares por lo que Millán (1941) las clasificó como sinónimas. Sin embargo, la clasificación actual del género acepta que son especies distintas (tal como lo describiera Miers en 1846), que habitan lugares topográficamente diferentes y geográficamente distantes.

Nierembergia repens es una especie pubescente, de polen simple, que habita las regiones centrales de Chile (Araucanía, Biobío, Los Ríos y Maule) entre los 0 y 500 metros de altura (Ruiz & Pavón, 1798; Miers, 1846; Rodríguez et al. 2008, 2018; Tate et al. 2009; Zuloaga et al. 2023). En cambio, *Nierembergia rivularis* es una especie glabra, con gránulos de polen dispuestos en tétrades y una distribución limitada al sistema

hidrográfico Paraná-del Plata en Argentina, Bolivia, Brasil y Uruguay (Miers, 1846; Cocucci & Hunziker, 1995b; Tate et al. 2009; Zuloaga et al. 2023).

Nierembergia veitchii fue considerada endémica en el estado brasileiro de Rio Grande do Sul y reportada como agente etiológico de calcinosis enzoótica en ovinos desde la década de 1960 (Riet-Correa et al. 1981; Tokarnia et al. 2000). Recientes estudios sobre la flora de Brasil han revelado que *N. veitchii* es en realidad una especie exótica en el territorio brasileiro, nativa de las regiones central y noroeste de Argentina (provincias de Jujuy, Salta, Catamarca, Tucumán y Santiago del Estero) (Cocucci & Hunziker, 1995b; Vignoli-Silva & Mentz, 2006). Consecuentemente, Vignoli-Silva & Mentz (2006, 2020) atribuyeron la etiología de los reportes de calcinosis enzoótica en ovinos de Rio Grande do Sul a *N. riograndensis*.

Las actualizaciones disponibles en la literatura acerca de la clasificación taxonómica del género *Nierembergia* y la distribución geográfica de sus especies, junto con la información generada en este trabajo, permiten concluir que la especie involucrada en la totalidad de los brotes de calcinosis enzoótica por *Nierembergia* en Uruguay, reportados hasta el momento en la bibliografía, es *Nierembergia rivularis* Miers.

Nierembergia rivularis está descripta en siete departamentos de Uruguay: Colonia, Durazno, Río Negro, Rocha, Rivera, Soriano y Tacuarembó. Los resultados de este trabajo mostraron que todos los lugares donde se encontraron comunidades de *N. rivularis* comparten la característica de encontrarse sobre la margen de una fuente de agua (arroyo, lago, río) o en terrenos anegables. Adicionalmente, la información obtenida de los herbarios y la bibliografía muestra que la distribución geográfica de esta especie en Uruguay se encuentra relacionada principalmente a las cuencas del Río Uruguay, Río de la Plata, Río Negro y del Río Cebollatí, coincidiendo con los hallazgos de este estudio. El término “*rivularis*” proviene del latín y significa “orilla del agua” o “de los ríos” (Gledhill, 2008), haciendo alusión al lugar donde John Miers encontró esta planta por primera vez (terrenos bajos en las márgenes del Río de la Plata) (Miers, 1846).

Sin embargo, los focos de calcinosis enzoótica en ovinos por intoxicación con *Nierembergia rivularis* tienen una distribución geográfica más acotada, localizándose la mayoría en el departamento de Tacuarembó. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el bajo stock ovino que presentan los departamentos del suroeste del país donde la planta fue reportada (Colonia, Río Negro y Soriano), región donde el principal rubro de producción es el agrícola (DIEA, 2023). Los lugares donde ocurrieron los focos presentan condiciones topográficas que propician el desarrollo de comunidades de *N. rivularis* en áreas pastoreables, y conjuntamente presentan una elevada dotación de ovinos (DIEA, 2023).

Si bien *Nierembergia rivularis* se encuentra presente en Argentina, Bolivia, Brasil y Uruguay (Vignoli-Silva & Mentz, 2020; POWO, 2023; Zuloaga et al. 2023), los únicos reportes de calcinosis enzoótica asociados a la intoxicación por esta especie corresponden a los brotes ocurridos en Uruguay. Esto podría explicarse por el sub-diagnóstico de la enfermedad, problemas para la identificación de la planta (dado su pequeño tamaño y las

dificultades que plantea su reconocimiento fuera del período de floración), baja dotación de ovinos en las regiones donde crecen las comunidades de *N. rivularis*, o que las condiciones ambientales no favorezcan su desarrollo de las plantas en los niveles necesarios para que se produzca la intoxicación. También existe la posibilidad de que existan diferentes quimiotipos de *N. rivularis*, que determinen variaciones de la toxicidad de la planta en las diferentes regiones donde se encuentra, tal como se ha reportado en otros géneros botánicos (Cook et al. 2009, 2011).

Los resultados cuantitativos en relación a la masa absoluta, masa relativa, densidad y morfometría de *Nierembergia rivularis* deben ser relativizados debido a que entre los años 2020 y 2023 las precipitaciones registradas en Uruguay mostraron una importante desviación en relación a la climatología (INUMET, 2023). Este prolongado período de sequía probablemente haya afectado dichos valores, por lo que su presencia en el campo y el tamaño de las plantas pueden haber sido subestimados.

Las dos zonas de muestreo seleccionadas para la caracterización de masa y morfología de *Nierembergia rivularis* presentaron diferencias significativas en la densidad absoluta y relativa de esta especie. Ambas se situaron dentro del mismo predio a pocos metros de distancia entre ellas. En estas zonas la masa y variedad de las demás especies botánicas fue similar, lo que estaría indicando que las diferencias encontradas en la masa y densidad de *N. rivularis* se atribuyeron principalmente a las características del terreno. En este sentido, ambas zonas representaron dos situaciones extremas que pueden presentarse en el campo natural de un establecimiento agropecuario. La presencia relativa de *N. rivularis* (tomando en cuenta ambas zonas) osciló entre el 0,7 y 46,1%, lo cual da una idea de la gran heterogeneidad con la que puede estar presente esta planta.

El contenido de materia seca promedio de *Nierembergia rivularis* (26,4%) fue similar al registrado en otras plantas de campo natural (Rosengurt et al. 1983) y pasturas cultivadas (Russell & Calistro, 2016) en Uruguay.

La masa de *Nierembergia rivularis* se distribuyó de manera heterogénea. En la planta verde las estructuras subterráneas (tallos y raíces adventicias) presentaron una masa hasta 7 veces superior que las estructuras aéreas (hojas y flores). Esta diferencia fue aún mayor cuando fue calculada en base seca (masa subterránea hasta 15,5 veces superior que la masa aérea). Tal como ocurre con *Cynodon dactylon*, el sistema de rizomas que presentan disminuye la productividad del campo natural compitiendo por el espacio subterráneo, nutrientes y agua. Además, son los responsables de la perpetuación y propagación de estas especies en el terreno (Ríos, 1999; Font Queer, 2000). Estas características constituyen un factor determinante para la elaboración de un plan de control químico de *N. rivularis*. Machado et al. (2020) describió el tratamiento químico recomendado, que se basa en la combinación de tres herbicidas sistémicos (2,4-D, Metsulfurón y Tordón) asociado al manejo estratégico del pastoreo en las áreas afectadas. Como se ha mencionado anteriormente, *N. rivularis* se desarrolla en zonas cercanas a grandes fuentes de agua y terrenos anegables. Esto constituye otro factor importante a la hora de considerar la factibilidad del control químico debido a las consecuencias ambientales asociadas y el marco legal vigente (Decreto Ley 15.239 MGAP del 23/12/1981; Resolución 129/008

DGSA del 27/02/08). Este trabajo es el primer estudio morfométrico de *Nierembergia rivularis* que aporta información cuantitativa que permite caracterizar esta especie en todas las etapas de su desarrollo. La descripción de sus estructuras y su fenología aportó información importante que contribuirá para el desarrollo de estrategias de prevención de calcinosis enzoóticas en nuestras condiciones de producción.

Las características que permiten diferenciar a esta especie son sus tallos radicales que forman rizomas subterráneos, las hojas espatuladas glabras que se observan emergiendo directamente desde la superficie del suelo, y la forma característica de sus flores (tubo corolino largo y firme, corola hipocretiforme en posición semi paralela al eje del suelo exponiendo sus estructuras reproductivas). La disposición en tétrades de los gránulos de polen representa un elemento característico de esta especie y fue confirmado en las plantas estudiadas (Miers, 1846; Cocucci & Hunziker, 1995b; Tate et al. 2009; Zuloaga et al. 2023).

La coloración violácea característica puede verse en los tallos, pecíolos de las hojas y en segmentos triangulares en los pétalos de las flores. Esta pigmentación se encuentra presente con mayor intensidad en plantas jóvenes y se debe a la producción de antocianinas en dichas estructuras. Su función está probablemente relacionada a la señalización de las estructuras reproductivas a los insectos polinizadores (Tate et al. 2009).

La observación de las estructuras de la flor bajo la lupa estereoscópica permitió describir la forma, coloración y distribución de los tricomas glandulares (elaióforos) descritos por Cocucci (1991) en otras especies de *Nierembergia*. Paralelamente se encontró un ejemplar de abeja nativa de la Tribu *Tapinotaspidini* en una flor de *N. rivularis*. La relación entre las abejas recolectoras de aceites y las flores oleíferas ha sido descrita en la bibliografía en estudios en Argentina (Cocucci, 1991). Sin embargo, nunca se había reportado esta interacción en Uruguay, existiendo muy poca información sobre las poblaciones de estas abejas nativas en nuestro territorio (Santos Com. Pers. 2023).

Si bien se ha descartado la autogamia en *Nierembergia rivularis* (Cocucci, 1991), su principal forma de reproducción es asexual (clonal), siendo el crecimiento de los rizomas su principal forma de propagación en el terreno (Cocucci A.A. Com. Pers. 2022).

En la naturaleza son escasas las especies botánicas que presentan flores oleíferas. *Nierembergia* es el único género dentro del grupo de las Solanáceas que presenta este tipo de flor (Cocucci, 1991; Maubecin et al. 2021). La permanencia de las estructuras secretoras de aceites (elaióforos) en las flores de estas plantas a lo largo de su evolución parecería ser funcional a la preservación de las poblaciones de abejas recolectoras de aceites. Éstas abejas se hallan involucradas en la polinización de múltiples especies botánicas además de *Nierembergia*, cumpliendo un importante rol en los ecosistemas de campo natural nativo (Cocucci, 1991; Tate et al. 2009; Maubecin et al. 2021).

La interacción de insectos del género *Astylus* con flores de *Nierembergia* ya ha sido reportado anteriormente, pero se ha descartado su rol como polinizadores efectivos de estas plantas (Cocucci, 1991).

En las visitas al campo durante la noche se comprobó que las flores de *Nierembergia rivularis* permanecen abiertas durante la noche, característica no ha sido reportada hasta el momento en la literatura. Esto permite a las flores servir de refugio a las especies de abejas colectoras de aceites de hábito solitario, existiendo la posibilidad de su interacción con insectos nocturnos.

El estudio observacional de las muestras de *Nierembergia rivularis* mantenidas en condiciones constantes de humedad por 18 meses junto con la información disponible en la bibliografía, permitieron constatar que se trata de una especie perenne que se mantiene presente en el campo debido a su importante biomasa subterránea. El prolongado período de floración que poseen las especies del género *Nierembergia* es característico y en esta especie se extiende desde finales de setiembre hasta abril.

El hecho de que algunos autores la hayan caracterizado como una especie anual que desaparece en los meses de invierno (García y Santos et al. 2012) puede ser explicado por el carácter estival de su ciclo fenológico. De este modo, la temperatura ambiente en invierno se encuentra fuera del rango necesario para el crecimiento vegetativo de *Nierembergia rivularis*, determinando que el pequeño porte de sus hojas y a la ausencia de flores dificulte su reconocimiento en esa época del año.

Como resultado asociado de este estudio, se ha demostrado la posibilidad de mantener y manipular las plantas de *Nierembergia rivularis* en condiciones experimentales fuera del campo. Las condiciones establecidas (panes de tierra de 20 cm de profundidad mantenidos en recipientes de plástico con adecuado drenaje y riego periódico) fueron adecuadas para observar la planta fuera de su ambiente, estableciendo las condiciones para futuros ensayos experimentales sobre esta especie.

Los análisis físico-químicos realizados sobre muestras de suelos revelaron que *Nierembergia rivularis* es capaz de crecer en una variedad de terrenos muy heterogénea, pudiendo estar presente en suelos arenosos, arcillosos y mixtos. En general los valores encontrados fueron los esperados para campos naturales sin mejoramiento en Uruguay, no mostrando limitaciones en relación al pH (que osciló entre ligeramente ácido a ligeramente alcalino), capacidad de intercambio catiónico y saturación de bases (la cual fue elevada en todos los casos) (Rabuffetti, 2017).

La mayor presencia de *Nierembergia rivularis* fue encontrada en terrenos deprimidos, fácilmente anegables (A1, B y C3), siendo escasa su presencia en elevaciones del terreno (A2, C1 y C2). Esto fue particularmente evidente en el establecimiento C, que presentó tres situaciones topográficas distintas y adyacentes (elevación, planicie y depresión del terreno) y que fueron consecuentes con las variaciones en la presencia de *N. rivularis*.

En el predio C pudieron observarse los efectos que las características físicas del suelo y la competencia por el espacio subterráneo ejercen sobre *Nierembergia rivularis*. Si bien el sitio C3 presentó el suelo con mayor potencial productivo (alto contenido de P, bases totales y capacidad de intercambio catiónico), los elevados niveles de arcilla y la importante presencia de otras especies rizomatosas (particularmente *Paspalum notatum*) actuaron como limitantes para el desarrollo de la biomasa subterránea de *N. rivularis*, lo

cual se vio reflejado en una menor biomasa aérea. Esta información puede ser tomada en cuenta a la hora de elaborar estrategias de control de *N. rivularis*. Existen trabajos en la bibliografía que describen la implantación de diversas especies de *Paspalum* como herramienta para el mejoramiento del campo natural (Giorello et al. 2021). Se trata de gramíneas perennes, estivales y rizomatosas, nativas de Uruguay y caracterizadas por su versatilidad y capacidad de adaptación a diversos suelos, elevado potencial de producción de forraje de alto valor nutritivo, con la capacidad de recuperar campos degradados y reducir el enmalezamiento (Giorello et al. 2021).

La información disponible en la bibliografía junto con los hallazgos descriptivos de este trabajo permite hipotizar que la estacionalidad con la que ocurren los brotes de calcinosis enzoótica se encuentre asociada a la combinación de dos factores. En primer lugar, el carácter perenne estival de *Nierembergia rivularis* determina una menor oferta de biomasa aérea en el campo durante los meses invernales (hojas más pequeñas y menor cantidad de plantas). En esa época las especies de invierno de campo natural ejercen una mayor presión de competencia, determinando una menor disponibilidad de *N. rivularis*. En segundo lugar, una menor producción de vitamina D y sus derivados durante el otoño e invierno relacionada a las variaciones climáticas estacionales de este período caracterizadas por bajas temperaturas, menores precipitaciones, menor tiempo de exposición a la luz solar y menor intensidad de la radiación UV (Mello & Habermehl, 1991; Boland et al. 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Estas condiciones ambientales determinarían que las plantas entren en un estado de latencia metabólica, disminuyendo los procesos involucrados en el crecimiento vegetativo y la rizogénesis (proceso regulado por la vitamina D y sus esteroides) (Mello & Habermehl, 1991; Boland et al. 2003). Para corroborar estas hipótesis se requieren más estudios que contemplen el metabolismo de la vitamina D en las plantas calcinogénicas.

Se logró comprobar que *Nierembergia rivularis* acumula derivados hidroxilados de vitamina D, tanto en sus estructuras aéreas (hojas y flores) como subterráneas (tallos y raíces), lo cual es una propiedad característica de las plantas calcinogénicas. Estos resultados son comparables con los hallazgos en *Solanum glaucophyllum* que presentó esteroides de vitamina D en todas las partes de la planta (Curino et al. 2001). Si bien no fue posible identificar la composición molecular de los compuestos encontrados, la proximidad de los picos observados en el HPLC al de los estándares de calcitriol y calcifediol permitió concluir que son químicamente muy similares. La identificación molecular de los derivados de vitamina D que poseen las plantas requiere el empleo técnicas más específicas y sensibles como la cromatografía líquida asociada a la espectrofotometría de masas (Jäpelt & Jakobsen, 2013).

Solanum glaucophyllum es la planta calcinogénica más estudiada en la bibliografía internacional, presentando altos niveles de derivados hidroxilados de vitamina D consistentemente en todos los estudios cuantitativos (Boland et al. 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Estudios sobre la toxicidad de cuatro plantas categorizaron a *S. glaucophyllum* (citado como *S. malacoxydon*) y a *Cestrum diurnum* como especies con mayor actividad calcinogénica que *Trisetum flavescens* y *Nierembergia riograndensis*

(citada como *N. veitchii*) (Mello & Habermehl, 1995). Los efectos sobre la calcemia y la fosfatemia de los animales fue atribuido al contenido de compuestos similares al calcitriol en forma libre (liposoluble), y conjugada a un glucósido (hidrosoluble) (Mello & Habermehl, 1995).

En este trabajo se analizaron muestras de hojas de *Solanum glaucophyllum* por HPLC de modo de tener un valor de referencia con el que comparar los niveles de derivados hidroxilados de vitamina D en *Nierembergia rivularis*. Los resultados obtenidos en *S. glaucophyllum* fueron menores a los obtenidos en las demás muestras. Esto puede atribuirse a las limitaciones de las técnicas empleadas (de extracción y análisis) que sólo detectarían las formas libres liposolubles de derivados de vitamina D y no las formas conjugadas (glucósidos) hidrosolubles descritos en *S. glaucophyllum* (Mello & Habermehl, 1995; Boland et al. 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013). Para sacar conclusiones sobre el grado de toxicidad de *N. rivularis* se deben realizar estudios que permitan identificar molecularmente los derivados hidroxilados de vitamina D, investigar la presencia de derivados glicosidados, y realizar experimentos *in vivo* con sus extractos tal como se ha realizado con otras especies calcinogénicas (Peterlik et al. 1976; Wasserman et al. 1976; Peterlik & Wasserman, 1978; Riet-Correa et al. 1987; Prema & Raghuramulu, 1994; Mello & Habermehl, 1995; Boland et al. 2003). No obstante, los valores encontrados de derivados hidroxilados de vitamina D se relacionan con una alta capacidad de la planta para metabolizar y almacenar estos compuestos, lo cual es una característica distintiva de las solanáceas calcinogénicas (Mello, 2003; Boland et al. 2003; Jäpelt & Jakobsen, 2013).

Los estudios sobre el contenido de derivados de vitamina D en plantas calcinogénicas son escasos en la bibliografía y presentan diferencias metodológicas que hacen difícil la comparación de sus resultados (Jäpelt & Jakobsen, 2013). El desarrollo de procedimientos estandarizados de toma y manipulación de muestras, y de técnicas de extracción y análisis moleculares (HPLC/MS), posibilitaría la comparación del contenido de derivados de vitamina D en las distintas especies calcinogénicas de Uruguay y la región, así como el estudio de los factores que determinan la variabilidad de la toxicidad de estas plantas.

CONCLUSIONES

Nierembergia rivularis Miers es el agente etiológico de los brotes de calcinosis enzoótica en ovinos y bovinos asociada a la intoxicación con plantas del género *Nierembergia* reportados en Uruguay.

La caracterización de la morfología, biología y fenología de *Nierembergia rivularis* pueden contribuir para el reconocimiento de esta especie y evitar errores de clasificación en el futuro.

El importante desarrollo de su biomasa subterránea (rizomas y raíces) le permite sobrevivir en el campo por largos períodos de tiempo, explicando el carácter perenne de su ciclo fenológico. Los principales requerimientos para su crecimiento se relacionan con alta humedad del terreno (prefiriendo superficies anegables o márgenes de fuentes de agua, y suelos de permeabilidad media), exposición solar directa y la textura mixta del suelo que, junto a una baja competencia de especies rizomatosas, permiten un óptimo desarrollo de su biomasa subterránea.

Nierembergia rivularis posee metabolitos hidroxilados de la vitamina D en todas las estructuras de la planta lo cual confirma sus propiedades tóxicas calcinogénicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arnold R.M., Fincham I.H. (1950). Cardiovascular and pulmonary calcification apparently associated with dietary imbalance in Jamaica. *J Comp Path* 60:51-64.
2. Arnold R.M., Fincham I.H. (1997). Manchester wasting disease: a calcinosis caused by a pasture grass (*Stenotaphrum secundatum*) in Jamaica. *Trop Anim Hlth Prod* 29:174-176.
3. Barros S.S., Pohlenz J., Santiago C. (1970). Zur Kalzinose beim Shaf [Sobre la calcinosis en ovejas]. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 77:346-349.
4. Black L.J., Lucas R.M., Sherriff J.L., Björn L.O., Bornman J.F. (2017). In pursuit of vitamin D in plants. *Nutrients* 9(2):136.
5. Boland R., Skliar M., Curino A., L. (2003). Vitamin D compounds in plants. *Plant Sci* 164:357-369.
6. Botha C.J., Penrith M.-L. (2008). Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. *J Ethnopharmacol* 119(3):549-558.
7. Botha C.J., Schultz R.A., Van der Lugt J.J., Retief E., Labuschagne L. (1999). Neurotoxicity in calves induced by the plant, *Nierembergia hippomanica* Miers var. *violacea* Millán in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 66:237-244.
8. Braun-Blanquet J. (1950). *Sociología vegetal. Estudio de las comunidades vegetales.* Ed. ACME, Buenos Aires.
9. Braun U., Diener M., Camenzind D., Flückiger Thoma R. (2000). Enzootic calcinosis in goats caused by golden oat grass (*Trisetum flavescens*). *Vet Rec* 146:161-162.
10. Buchala A.J., Schmid A. (1979). Vitamin D and its analogues as a new class of plant growth substances affecting rhizogenesis. *Nature* 280:230-231.
11. Buschi C.A., Pomilio A.B. (1987). Pyrrole-3-carbamidine: A lethal principle from *Nierembergia hippomanica*. *Phytochem* 26(3):863-865.
12. Campero C.M., Odriozola E. (1990). A case of *Solanum malacoxylon* toxicity in pigs. *Vet Hum Toxicol* 32(3):238-239.
13. Cocucci A.A. (1991). Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Pl Syst Evol* 174:17-35.
14. Cocucci A.A., Hunziker A.T. (1993). Estudios sobre *Solanaceae* XXXV. Novedades en *Nierembergia*. *Lorentzia* 7:5-15
15. Cocucci A.A., Hunziker A.T. (1995). Estudios sobre *Solanaceae*. XLI. *Nierembergia linariaefolia* y *N. pulchella*: sus sinónimos y variedades. *Darwiniana* 33(1-4):35-42.
16. Cocucci A.A., Hunziker A.T. (1995b). Subtribu VII b. *Nierembergiinae*. *Fl Fanerog Argent* 15:3-16.
17. Cocucci A.A. (2013). *Nierembergia* Ruiz & Pav. En: Clausen A., Chiarini F.E., Cocucci A.A., Cosa M.T., Giacomini L., Greppi J.A., Knapp S., Machado S., Matesevach Becerra M., Peralta I.E., Rodrigues I.M.C., Romanutti A.A., Särkinen T.E., Spooner D., Stehmann J.R., Stern S., Toledo J.M. (2013) *Flora Argentina: Flora vascular de la República Argentina. Vol. 13: Dicotyledoneae, Solanaceae.* Ed. Estudio Sigma SRL, Buenos Aires, p.114.

18. Cook D., Gardner D.R., Pfister J.A., Welch K.D., Green B.T., Lee S.T. (2009). The biogeographical distribution of duncecap larkspur (*Delphinium occidentale*) chemotypes and their potential toxicity. *J Chem Ecol* 35:643-652.
19. Cook D., Green B.T., Welch K.D., Gardner D.R., Pfister J.A., Panter K.E. (2011). Comparison of the toxic effects of two duncecap larkspur (*Delphinium occidentale*) chemotypes in mice and cattle. *Am J Vet Res* 72(5):706-714.
20. Curino A., Milanesi L., Benassati S., Skliar M., Boland R. (2001). *Phytochemistry* 58(1):81-89.
21. DIEA (2023). Anuario Estadístico Agropecuario 2023. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay, 284p.
22. Döbereiner J., Tokarnia C.H., Costa J.B.D., Campos J.L.E., Dayrell M.S. (1971). “Espichamento”, intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon*, no Pantanal de Mato Grosso. *Pesqu Agropecu Bras* 6:91-117.
23. Durand R., Figueredo J.M., Mendoza E. (1999). Intoxication in cattle from *Cestrum diurnum*. *Vet Hum Toxicol* 41(1):26-27.
24. Dutra F. (2013). Calcinosis enzoótica en ovejas (*Nierembergia veitchii*). En: Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional DILAVE Treinta y Tres. 5(16-19):15-16.
25. Fernández G., Johnston M. (1986). Fisiología vegetal experimental. Ed. IICA, San José, Costa Rica.
26. Font Quer P. (2000). Diccionario de botánica. Ed. Península. 1º ed. Barcelona.
27. García y Santos C., Pereira R., Etcheberry G., Goyen J.M., Pérez W., Capelli A., Alonso E., Ruiz-Díaz A., Riet-Correa F. (2012). Enzootic calcinosis caused by *Nierembergia rivularis* in sheep. *Journ Vet Diagn Inv* 24(2):423-426.
28. Germishuizen G., Meyer N. (2003). Plants of southern Africa: an annotated checklist. National Botanical Institute, Pretoria.
29. Giorello D., Do Canto J., Porcile V., De Barbieri I., Soares de Lima J.M., Montossi F., Rossi C., Maranges F., Reyno R. (2021). *Paspalum notatum* INIA Sepé: una gramínea nativa de alta productividad y persistencia. *Revista INIA* 66:51-24.
30. Gledhill D. (2008). The names of plants. Cambridge University Press. 4ta ed. Reino Unido.
31. Guedes K.M.R., Colodel E.M., Castro M.B., Souza M.A., Arruda L.P., Dianezi D.M., Borges J.R.J., Riet-Correa F. (2011). Calcinose enzoótica em ruminantes no Brasil Central. *Pesq Vet Bras* 31(8):643-648.
32. Habib A., Donnelly D.J. (2003). Vitamin D improves calcium uptake into micropropagated potato plantlets. *Acta Hort* 619:263-269.
33. Haussler M.R., Wasserman R.H., McCain T.A., Peterlik M., Bursac K.M., Hughes M.R. (1976). 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside: identification of a calcinogenic principle of *Solanum malacoxylon*. *Life Sci* 18:1049-1056.
34. Iglesias V.J., Costa E.F., Gimeno, E.J. (2008). Calcinosis enzoótica en caprinos en la provincia de San Luis. *Revta Arg Prod Anim* 28(1):333-334.
35. INUMET (2023). Boletines climáticos. Publicados en internet; <https://www.inumet.gub.uy/sala-de-prensa/boletines>. Consultado el 04 de noviembre de 2023.

36. Jäpelt R.B., Jakobsen J. (2013). Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci* 136(4):1-20.
37. Koshy K.T. (1980). High-performance liquid chromatographic determination of vitamin D and metabolites. *Methods Enzymol* 67:357-370.
38. Krook L., Wasserman R.H., Shively J.N., Tashjian Jr A.H., Brokken T.D., Morton J.F. (1975). Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: implication of the shrub, *Cestrum diurnum*, as the causative agent. *Cornell Vet* 65(1):26-56.
39. Machado M., Schild C.O., Preliasco M., Balserini A., Medeiros R.M.T., Barros S.S., Riet-Correa F. (2020). Enzootic calcinosis in sheep in Uruguay: a brief review and report of two outbreaks. *Pesq Vet Bras* 40(11):831-836.
40. Machado M., Preliasco M., Schild C.O., Costa R.A., Balserini A., Giannitti F., Riet-Correa F. (2020b). Thyroid parafollicular cell hyperplasia and carcinoma in a sheep with enzootic calcinosis due to *Nierembergia rivularis* poisoning. *Arq Bras Med Vet Zootec* 72(4):1561-1565.
41. Machado M., Castro M.B., Wilson T.M., Gonçalves A.A.B., Portiansky E.L., Riet-Correa F., Barros, S.S. (2022). Poisoning by *Nierembergia veitchii*: Effects on vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of enzootic calcinosis. *Vet Pathol* 59(5):814-823.
42. Maubecin C.C., Rocamundi N., Palombo N., Aguirre L.A., Cocucci A.A., Sérsic A.N. (2021). Teasing out the functional groups of oil collecting bees in the light. *Arthropod-Plant Interact* 15:809-819.
43. Mederos A., Easton M.C., Paullier C., Gago M., Franchi M., Bové R. (1991). Comprobación de intoxicación por *Nierembergia repens* en ovinos del Uruguay. X Jornadas veterinarias de ovinos, DIAS, MES, Tacuarembó, Uruguay, P-4.
44. Melgarejo L., Romero M., Hernández S., Barrera J., Solarte M., Suárez D., Pérez L., Rojas A., Cruz M., Moreno L., Crespo S., Pérez W. (2010). Experimentos en fisiología vegetal. Ed. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
45. Mello J.R.B., Habermehl G. (1991). Einfluss ultravioletter Strahlen und klimatischer Bedingungen (Sonneneinstrahlung und Temperatur) auf die kalzinogene Aktivität von *Trisetum flavescens* und *Nierembergia veitchii* [El efecto de los rayos ultravioletas y condiciones climáticas (radiación solar y temperatura) sobre la actividad calcinogénica de *Trisetum flavescens* y *Nierembergia veitchii*]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 98(12):462-5.
46. Mello J.R.B., Habermehl G. (1995). Substâncias com atividade similar à vitamina D₃ em quatro plantas calcinogênicas. *Pesq Vet Bras* 15(2/3):73-78.
47. Mello J.R.B., Langeloh A., Habermehl G., Krebs H., Bastos F., Alvares F. (2000). Efeitos de extratos de *Nierembergia veitchii* (Hook) Solanaceae sobre a fertilidade de ratas e morfologia óssea dos fetos. *Ciência Rural*, 30(3):411-415.
48. Mello J.R.B. (2003). Calcinosis-calcinogenic plants. *Toxicon* 41(1):1-12.
49. Miers J. (1846). Contributions to the flora of South America. En: Hooker W.J. (1846). London J Bot Vol. 5. Ed. Hyppolyte Baillière, Londres, pp.144-190.
50. Miers J. (1850). Illustrations of South American Plants. Vol. 1. Ed. Hyppolyte Baillière, Londres.

51. Milanesi L.M., Vasconsuelo A., Stockman G., Boland R. (2005). Production of vitamin D compounds in plants: Biotechnological implications. *Plant Genetic Engineering*. 20p.
52. Millán R. (1941). Revisión de las especies del género *Nierembergia* (Solanaceae). *Darwiniana* 5:487-547.
53. Morris K.M., Simonite J.P., Pullen L., Simpson J.A. (1979). *Solanum torvum* as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea. *Res Vet Sci* 27(2):264-266.0
54. Norman A.W. (2003). Steroid Hormones. En: Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press 2ª ed. Países Bajos, Cap. Hormones, pp.3166-3174.
55. Odiñi A., Rivero R., Riet Correa F., Méndez C., Giannechini E. (1995). Intoxicación por *Nierembergia hippomanica* en bovinos y ovinos. *Veterinaria (Montevideo)* 31(127):3-8.
56. Odriozola E.R., Rodríguez A.M., Micheloud J.F., Cantón G.J., Caffarena R.D., Gimeno E.J., Bodega J.J., Gardey P., Iseas F.B., Giannitti F. (2018). Enzootic calcinosis in horses grazing *Solanum glaucophyllum* in Argentina. *J Vet Diagn Invest* 30(2):286-289.
57. Okada K.A., Carrillo B.J., Tilley M. (1977). *Solanum malacoxylon* Sendtner: a toxic plant in Argentina. *Econ Bot* 31:225-236.
58. Peterlik M., Bursac K., Haussler M.R., Hughes M.R., Wasserman R.H. (1976). Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity of *Solanum malacoxylon*. *Biochem Biophys Res Commun* 70(3):797-804.
59. Peterlik M., Wasserman R.H. (1978). Stimulatory effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol-like substances from *Solanum malacoxylon* and *Cestrum diurnum* on phosphate transport in chick jejunum. *J Nutr* 108(10):1673-1679.
60. Pomilio A.B., Falzoni E.M., Vitale A.A. (2008). Toxic chemical compounds of the Solanaceae. *Nat Prod Commun* 3(4):593-628.
61. POWO (2023). Plants of the World Online. The Royal Botanic Gardens, Kew. Publicado en internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/>. Consultado el 18 de octubre de 2023.
62. Preliasco M., López F., Balserini A., Freire I., Collazo S., Uriarte G., Bové R., González A.C. (2014). Descripción de tres focos de calcinosis enzoótica en ovinos (intoxicación por *Nierembergia repens* Ruiz & Pav.) diagnosticados en Uruguay. *XLII Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 5-6, junio, Paysandú, P.257-259.
63. Prema T.P., Raghuramulu N. (1994). Free vitamin D₃ metabolites in *Cestrum diurnum* leaves. *Phytochemistry* 37(3):677-681.
64. Prema T.P., Raghuramulu N. (1996). Vitamin D₃ and its metabolites in the tomato plant. *Phytochemistry* 42(3):617-620.
65. Rabuffetti A. (2017). La fertilidad del suelo y su manejo. Vol. I y II. Ed. Hemisferio del Sur, 1ª ed. Buenos Aires.
66. Rambeck W., Oesterhelt W., Vecchi M., Zucker H. (1979). Occurrence of cholecalciferol in the calcinogenic plant *Trisetum flavescens*. *Biochem Biophys Res Commun* 87(3):743-749.

67. Rambeck W.A., Kreutzberg O., Bruns-Droste C., Zucker H. (1981). Vitamin D₃ in the grass *Trisetum flavescens*. *Z Pflanzenphysiol* 104(1):9-16.
68. Riet-Correa F., Riet-Correa I., Bellagamba C. (1975). Calcificación metastásica enzoótica (enteque seco) en bovinos del Uruguay. *Veterinaria, Uruguay* 12:15-23.
69. Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Petiz C.A., Scarsi R. (1980). Reprodução experimental de calcinose enzoótica em ovinos mediante a administração de *Nierembergia veitchii*. XVII Congr Bras Med Vet, 20-25, octubre, Fortaleza, Brasil, P-105.
70. Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Santos E.C., Scarsi R. (1981). Experimentos em coelhos sugerem *Nierembergia veitchii* como causa de calcinose enzoótica em ovinos do Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Bras* 16:727-732.
71. Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Wasserman R., Krook L. (1987). Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq Vet Bras* 7(3):85-95.
72. Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L. (1993). Intoxicaciones por plantas e micotóxicos em animais domésticos. Volume I. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. 1º ed. Montevideo.
73. Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Petiz C.A. (1993b). Enzootic calcinosis in sheep. Experimental reproduction with *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesq Vet Bras* 13(1/2):21-24.
74. Riet-Correa F., Medeiros R.M. (2001). Intoxicaciones por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq Vet Bras* 21(1):38-42.
75. Ríos A. (1999). Dinámica y control de *Cynodon dactylon* L. en sistemas pastoriles. *Revista de la Facultad de Agronomía, UBA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.* 19pp.
76. Rissi D.R., Brown C.C., Barros C.S.L. (2009). Chronic and acute clinical manifestations associated with systemic mineralization caused by ingestion of *Nierembergia veitchii* in sheep in southern Brazil. *Small Ruminant Res* 87:102-104.
77. Rissi D.R., Pierezan F., Oliveira Filho J.C., Figuera R.A., Irigoyen L.F., Kommers G.D., Barros C.S. (2010). Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. *Pesq Vet Bras* 30(1):21-28.
78. Rissi D.R., Rech R.R., Pierezan F., Kommers G.D., Barros C.S.L. (2007). Poisoning in sheep by *Nierembergia veitchii*: observations in four outbreaks. *Ciênc Rural* 37(5):1393-1398.
79. Rodríguez R., Grau J., Baeza C., Davies A. (2008). Lista comentada de las plantas vasculares de los nevados de Chillán, Chile. *Gayana Bot* 65(2):153-197.
80. Rodríguez R., Marticorena C., Alarcón D., Baeza C., Cavieres L., Finot V.L., Fuentes N., Kiessling A., Mihoc M., Pauchard A., Ruiz E., Sánchez P., Marticorena A. (2018). Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Bot* 75(1):1-430.
81. Rosengurt B., Boggiano P., Vidal A. (1983). Contenido de materia seca invernol en pastos perennes. 6ª Reunión Técnica de Facultad de Agronomía, UDELAR, 5-6, diciembre, Montevideo, Uruguay, P-85.

82. Rossanigo C.E., Parnisari E.P., Page W.J., Frigerio P.C., Sager R.L. (2020). *Solanum stuckertii* Bitter, nueva planta tóxica causante de calcinosis enzoótica caprina: evaluación experimental de su toxicidad. *Vet Argent* 37:1-18.
83. Ruiz H., Pavon J. (1794). Descripciones y láminas de los nuevos géneros de plantas de la flora del Perú y Chile (*Florae peruvianaee et chilensis prodromus*). Ed. Imprenta de Sancha, Madrid.
84. Ruiz H., Pavon J. (1798). *Systema vegetabilium florae Peruvianaee et Chilensis: characteres prodromi genericos differentiales (...)*. Ed. Imprenta Gabrielis de Sancha, Madrid.
85. Russell H., Calistro E. (2016). Evolución interanual del contenido de materia seca en evaluaciones forrajeras por cortes de pasturas cultivadas del Uruguay. 25° Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal y 11° Congreso Nordesteño de Produção Animal, 7-10, noviembre, Recife, Pernambuco, Brasil, P. 07-10.
86. Saini V., Nadeem M., Kolb C., Gangloff S., Zivadnov R., Ramanathan M., Weinstock-Guttman B. (2016). Vitamin D: Role in Pathogenesis of Multiple Sclerosis. En: Minagar A. (2016). Multiple Sclerosis. A mechanistic view. Academic Press, Reino Unido, Cap. 7, pp.127-152.
87. Schild C.O., Boabaid F., Machado M., Saravia A., Oliveira L.G.S., Díaz S., Vildoza A., Martinez A., Martínez R., Barros S.S., Riet-Correa F. (2021). *Nierembergia rivularis* poisoning in cattle. *Toxicon* 204:21-30.
88. Schmid A., Buchala A.J. (1987). An examination of the growth substance activity of vitamin D₃. *J. Plant Growth Regul* 5:175-180.
89. Sequeira M.A., Fiego M.L., Coria J.D., Castro M.J., Faraoni M.B. (2022). Identification of vitamin D₃ hydroxylated metabolites in *Solanum glaucophyllum*, leaves: towards its biosynthetic pathway elucidation. *Chem Proc* 8(1):107.
90. Shinnors L.H. (1963). *Leptoglossis* and *Nierembergia* (Solanaceae) in Texas. *SIDA, Contributions to Botany* 1(3):180-181.
91. Skliar M., Curino A., Milanesi L., Benassati S., Boland R. (2000). *Nicotiana glauca*: another plant species containing vitamin D₃ metabolites. *Plant Sci* 156(2):193-199.
92. Sosef M.S.M., Degreef J., Engledow H., Meerts P. (2021). Clasificación botánica y nomenclatura, una introducción. Ed. Botanic Garden, Meise.
93. Soto M.S. (2007). Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramienta del mejoramiento. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
94. Symon D.E. (1981). The Solanaceous genera, *Browallia*, *Capsicum*, *Cestrum*, *Cyphomandra*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nierembergia*, *Physalis*, *Petunia*, *Salpichroa* and *Withania*, naturalized in Australia. *J Adelaide Bot Gard* 3(2):133-166.
95. Tate J.A., Acosta C., McDill J., Moscone E.A., Simpson B.B., Cocucci A.A. (2009). Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological, and cytogenetic evidence. *Syst Bot* 34(1):198-206.
96. Tokarnia C.H., Dobereiner J., Peixoto P.V. (2000). Plantas tóxicas do Brasil. Ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

97. Torino F., Colque-Caro L.A., Martínez O., Micheloud J.F. (2017). Intoxicación experimental con *Nierembergia linariifolia* var. *linariifolia* en cabras. FAVE, Secc Cienc Vet 16(2):66-69.
98. Torres C.A. (1966). Tratado elemental de historia natural (primera parte), Botánica. Ed. Barreiro y Ramos S.A., 9^{na} ed. Montevideo.
99. UNIRADD (2023). Unidad de Registros de Diagnósticos - Base de Datos de División de Laboratorios Veterinarios, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay. www.mgap.gub.uy
100. Vasconcelos R.O., Barros S.S., Russowski D., Grandó S.M., Irigoyen L.F. (1998). Arterial diffuse intimal thickening associated with enzootic calcinosis of sheep. Pesq Vet Bras 18(1):9-15.
101. Vignoli-Silva M., Mentz L.A. (2006). O gênero *Nierembergia* Ruiz & Pav. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Sér Botânica Porto Alegre 61(1-2):139-155.
102. Vignoli-Silva M., Mentz L.A. (2020). *Nierembergia*. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponible en: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14683>>. Acceso el 04 set. 2023.
103. Villaseñor J.L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. Rev Mex Biodivers 87:559-902.
104. Wang M., Zhang J., Guo Z., Guan Y., Qu G., Liu J., Guo Y., Yan X. (2020). Morphological variation in *Cynodon dactylon* (L.) Pers., and its relationship with the environment along a longitudinal gradient. Hereditas 157:4.
105. Wasserman R.H., Henion J.D., Haussler M.R., McCain T.A. (1976). Calcinogenic factor in *Solanum malacoxylon*: evidence that it is 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ glycoside. Science 194(4267):853-855.
106. Wasserman R.H., Peterlik M., Haussler M.R., Hughes M.R., Bursac K.M., Krook L. (1976b). The calcinogenic plants: their nature and mechanism of action. Israel J Med Sci 12:1492.
107. Welman W.G. (2003). Solanaceae. En: Germishuizen G., Meyer N.L. (2003). Plants of southern Africa: an annotated checklist. Strelitzia 14. National Botanical Institute, Pretoria. pp.913-918.
108. Worker N.A., Carrillo B.J. (1967). "Enteque seco", calcification and wasting in grazing animals in the Argentine. Nature, 215(5096):72-74.
109. Zuloaga F.O., Morrone O., Belgrano M.J., Martincorena C., Zanotti C.A., Marchesi E. (2023). Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. Instituto de Botánica Darwinion. Publicado en internet; <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>. Consultado el 18 de octubre de 2023.

ANEXOS

Anexo I. Información adicional sobre las especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav. aceptadas actualmente

Cuadro XVIII. Sinonimia de las especies de *Nierembergia* Ruiz y Pav. aceptadas en la clasificación taxonómica vigente.

| Especie | Sinónimos y combinaciones |
|--|---|
| <i>Nierembergia angustifolia</i> Kunth | S/D |
| <i>Nierembergia aristata</i> D. Don | <i>Nierembergia angustifolia</i> Kunth var. <i>intermedia</i> <i>Nierembergia aristata</i> D. Don var. <i>stricta</i> <i>Nierembergia prostrata</i> Millán <i>Nierembergia stricta</i> Miers |
| <i>Nierembergia browallioides</i> Griseb. | <i>Nierembergia graveolens</i> A. St.-Hil. var. <i>grandiflora</i> <i>Nierembergia parodii</i> Millán |
| <i>Nierembergia calycina</i> Hook. | <i>Siphonema longiflora</i> Raf., nom. inval. |
| <i>Nierembergia ericoides</i> Miers | S/D |
| <i>Nierembergia espinosae</i> Steyerm. | S/D |
| <i>Nierembergia graveolens</i> A. St.-Hil. | S/D |
| <i>Nierembergia hatschbachii</i> A. A. Cocucci & Hunz. | S/D |
| <i>Nierembergia linariifolia</i> Graham var. <i>linariifolia</i> | <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>scabridopilosa</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>typica</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>caerulea</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>mesopotamica</i> <i>Nierembergia gracilis</i> Hook. <i>Nierembergia gracilis</i> Hook. var. <i>guaranitica</i> <i>Stimenes gracilis</i> (Hook.) Raf. <i>Nierembergia filicaulis</i> Lindl. <i>Siphonema filicaulis</i> (Lindl.) Raf. <i>Blenocoes filicaulis</i> (Lindl.) Raf. <i>Nierembergia caerulea</i> Gillies ex Miers* <i>Nierembergia angustifolia</i> Kunth var. <i>filicaulis</i> <i>Nierembergia scoparia</i> Sendtn. var. <i>glaberrima</i> |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>glabriuscula</i> (Dunal) A. A. Cocucci & Hunz. | <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>glabriuscula</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>montana</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>densa</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>dubia</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>elata</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>violacea</i> <i>Nierembergia montana</i> (Griseb.) Hieron. <i>Nierembergia aristata</i> D. Don var. <i>montana</i> |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>pampeana</i> (Millán) A. A. Cocucci & Hunz. | <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>pampeana</i> |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>pinifolioides</i> | <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>pinifolioides</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>rubricaulis</i> <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>crispa</i> |
| <i>Nierembergia micrantha</i> Cabrera | S/D |
| <i>Nierembergia pinifolia</i> Miers | S/D |

| | |
|--|---|
| <i>N. pulchella</i> var. <i>pulchella</i> Gillies ex Miers | <i>Nierembergia andina</i> Millán <i>Nierembergia boliviana</i> Millán <i>Nierembergia canescens</i> Millán <i>Nierembergia catamarcensis</i> Millán |
| <i>N. pulchella</i> var. <i>longistyla</i> A.A.Cocucci & Hunz. | <i>Nierembergia longistyla</i> Millán |
| <i>N. pulchella</i> var. <i>macrocalyx</i> A.A.Cocucci & Hunz. | <i>Nierembergia vivacissima</i> Millán <i>Nierembergia pilosa</i> Millán <i>Nierembergia grandiflora</i> Millán <i>Nierembergia famatinensis</i> Millán <i>Nierembergia macrocalyx</i> Millán |
| <i>Nierembergia repens</i> Ruiz & Pav. | <i>Nicotiana minima</i> Molina <i>Nierembergia minima</i> (Molina) I.M.Johnst. <i>Petunia minima</i> (Molina) Reiche |
| <i>Nierembergia rigida</i> Miers | <i>Nierembergia aristata auct. non</i> D.Don |
| <i>Nierembergia riograndensis</i> Hunz. & A.A.Cocucci | S/D |
| <i>Nierembergia rivularis</i> Miers | <i>Nierembergia repens auct. non</i> Ruiz & Pav. <i>Nierembergia petiolata</i> J.Rémy |
| <i>Nierembergia scoparia</i> Sendtn. | <i>Nierembergia frutescens</i> Durieu <i>Nierembergia scoparia</i> Sendtn. var. <i>longipedicelata</i> <i>Nierembergia scoparia</i> Sendtn. var. <i>breviflora</i> <i>Nierembergia angustifolia</i> Kunth f. <i>frutescens</i> <i>Nierembergia fruticosa</i> Voss |
| <i>Nierembergia spathulata</i> Kunth | <i>Nierembergia spathulata</i> var. <i>pilosella</i> Dunal <i>Nierembergia stuebelii</i> Hieron. ex Francey* |
| <i>Nierembergia tandilensis</i> (Kuntze) Cabrera | <i>Nierembergia ericoides</i> Miers var. <i>tandilensis</i> <i>Nierembergia graveolens</i> A. St.-Hil. var. <i>tandilensis</i> |
| <i>Nierembergia tucumanensis</i> Millán | S/D |
| <i>Nierembergia veitchii</i> Hook. | S/D |

var. = variedad; nom. inval. = nombre inválido; S/D = Sin datos en la bibliografía consultada. Referencias: Cocucci & Hunziker (1995b); POWO (2023); Zuloaga et al. (2023). *El conector “ex” es empleado en nomenclatura botánica cuando un autor publica un taxón de manera válida, pero adscribe el nombre a otra persona (que le sugirió el nombre por ej). En ese caso se coloca el nombre de dicha persona seguida del conector “ex” y el autor o autores que publicaron el taxón de manera válida (Sosef et al. 2021).

Cuadro XIX. Información de los autores y las publicaciones originales de las especies de *Nierembergia* aceptadas actualmente.

| Información sobre los autores | Abreviatura (IPNI) | Especie identificada [publicación] |
|--|-------------------------|--|
| <p>Hipólito Ruiz López (1754-1815) Botánico y farmacéutico español</p> <p>&</p> <p>José Antonio Pavón y Jiménez (1754-1844) Botánico español</p> | <p>Ruiz</p> <p>Pav.</p> | <p><i>Nierembergia repens</i> [Ruiz H., Pavon J. (1798). <i>Systema vegetabilium florum Peruviana et Chilensis: characteres prodromi genericos differentiales</i> (...). Ed. Imprenta Gabrielis de Sancha, Madrid].</p> |
| <p>Karl (Carl) Sigismund Kunth (1788-1850) Naturista y botánico alemán</p> | Kunth | <p><i>Nierembergia angustifolia</i> y <i>N. spatulata</i> [Kunth C.S. (1818). <i>Nova Genera et Species Plantarum</i> (H.B.K.). 3(14):6-7].</p> |
| <p>Auguste François César Prouvençal de Saint-Hilaire (1779-1853) Botánico y explorador francés</p> | A.St.-Hil. | <p><i>Nierembergia graveolens</i> [Saint-Hilaire A. (1824). <i>Hist. Pl. Remarq. Bresil</i> 1:221].</p> |
| <p>David Don (1799-1841) Botánico escocés</p> | D.Don | <p><i>Nierembergia aristata</i> [Sweet R. (1828). <i>Brit. Fl. Gard.</i> 3(2):55].</p> |
| <p>Robert Graham (1786-1845) Médico y botánico inglés</p> | Graham | <p><i>Nierembergia linariifolia</i>* [Graham (1831). Description of several new or rare plants which have lately flowered in the neighbourhood of Edinburgh, and chiefly in the Royal Botanic Garden. <i>Edinburgh New Philos. J.</i> 11:376-380]. *Publicada como <i>Nierembergia linariaefolia</i>.</p> |
| <p>William Jackson Hooker (1785-1865) Ilustrador botánico, botánico, micólogo, pteridólogo, briólogo y algólogo inglés</p> | Hook. | <p><i>Nierembergia calycina</i> [Curtis S., Hooker W.J. (1834). <i>Bot. Mag.</i> 8(2):t.3371].</p> <p><i>Nierembergia veitchii</i> [Hooker J.D. (1866). <i>Bot. Mag.</i> 22(3):t.5599].</p> |
| <p>John Miers (1789-1879) Botánico, pteridólogo e ingeniero inglés</p> | Miers | <p><i>Nierembergia ericoides</i> [Miers J. (1846) Contributions to the botany of South America. En: Hooker W.J. <i>London J. Bot.</i> 5:164-176].</p> <p><i>Nierembergia pinifolia</i> [Miers J. (1846) Contributions to the botany of South America. En: Hooker W.J. (1846). <i>London J. Bot.</i> 5:164-176].</p> <p><i>Nierembergia rigida</i> [Trav. Chile ii. 532. En Hooker W.J. (1846) <i>Lond. Journ. Bot.</i> 172].</p> <p><i>Nierembergia rivularis</i> [Miers J. (1846) Contributions to the botany of South America. En: Hooker W.J. <i>London J. Bot.</i> 5:164-176].</p> |
| <p>John Gillies (1792-1834) Médico y botánico escocés</p> | Gillies | <p><i>Nierembergia pulchella</i> [Miers J. (1846) Contributions to the botany of South America. En: Hooker W.J. <i>London J. Bot.</i> 5:164-176].</p> |

| | | |
|---|-------------|---|
| Otto Sendtner (1813-1859) Botánico, ecólogo y profesor universitario alemán | Sendtn. | <i>Nierembergia scoparia</i> [Sendtner O. (1846). Solanaceae et Cestrineae. Fl. Bras. (Martius) 10(6):178]. |
| Anibal Roberto Millán (1892-?) Agrónomo argentino | Millán | <i>Nierembergia tucumanensis</i> [Millán R. (1941). Revisión de las especies del género <i>Nierembergia</i> (Solanaceae). Darwiniana 5:487-547]. |
| Julian Alfred Steyermark (1909-1988) Botánico estadounidense | Steyerm. | <i>Nierembergia espinosae</i> [Steyermark J.A. (1964). Notes on Ecuador Plants. Phytologia 9(6):337-350]. |
| Ángel Lulio Cabrera (1908-1999) Botánico y fitogeógrafo argentino | Cabrera | <i>Nierembergia tandilensis</i> [Cabrera A.L. (1965). Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 5a:245]. <i>Nierembergia micrantha</i> [Cabrera A.L. (1977). Hickenia 1(14):79-81]. |
| Armando Theodoro Hunziker (1919-2001) Botánico argentino | Hunz. | <i>Nierembergia hatschbachii</i> y <i>Nierembergia</i> <i>riograndensis</i> [A.A.Cocucci & Hunz. (1993). Estudios sobre Solanaceae XXXXV. Novedades en <i>Nierembergia</i> . Lorentzia 7:5-15]. <i>Nierembergia linariifolia</i> var. <i>glabriuscula</i> (Dunal)*. Basónimo: <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>glabriuscula</i> Dunal [DC, Prodr. (1852) 13(1):584]. Basado en <i>Nierembergia hippomanica</i> var. β Miers. [Hooker W.J. (1846). London J. Bot. 5:168]. <i>Nierembergia linariifolia</i> var. <i>pampeana</i> (Millán)*. Basónimo: <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>pampeana</i> Millán [Millán R. (1941). Darwiniana 5:487-547]. |
| & | | <i>Nierembergia linariifolia</i> var. <i>pinifolioides</i> (Millán)*. Basónimo: <i>Nierembergia hippomanica</i> Miers var. <i>pinifolioides</i> Millán [Millán R. (1941). Darwiniana 5:487-547]. |
| Andrea Aristides Cocucci (1959-) Biólogo, zoólogo y botánico argentino | A.A.Cocucci | <i>Nierembergia pulchella</i> var. <i>longistyla</i> (Millán)*. Basónimo: <i>Nierembergia longistyla</i> Millán [Millán R. (1941). Darwiniana 5:487-547]. <i>Nierembergia pulchella</i> var. <i>macrocalyx</i> (Millán)*. Basónimo: <i>Nierembergia macrocalyx</i> Millán [Millán R. (1941). Darwiniana 5:487-547]. |
| | | *[Publicadas en Cocucci A.A., Hunziker A.T. (1995). Estudios sobre Solanaceae. XLI. <i>Nierembergia linariaefolia</i> y <i>N. pulchella</i> : sus sinónimos y variedades. Darwiniana 33(1-4):35-42]. |

var. = variedad. Referencias: *International Plant Names Index (IPNI)* (ipni.org); *Instituto de Botánica Darwinion* (darwin.edu.ar).

Cuadro XX. Distribución geográfica de las especies de *Nierembergia* reportada en la bibliografía.

| Especie | Distribución geográfica | |
|--|--|---|
| | Nativa | Exótica |
| <i>Nierembergia angustifolia</i> | México ^a | |
| <i>Nierembergia aristata</i> | Argentina ^{a,b} , Brasil ^{a,b} , Paraguay ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia browallioides</i> | Argentina ^{a,b} , Bolivia ^a | |
| <i>Nierembergia calycina</i> | Argentina ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia ericoides</i> | Argentina ^{a,b} , Uruguay ^b | |
| <i>Nierembergia espinosae</i> | Ecuador ^a | |
| <i>Nierembergia graveolens</i> | Argentina ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia hatschbachii</i> | Brasil ^{a,b} | |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>linariifolia</i> | Argentina ^{a,b} , Bolivia ^a , Brasil ^{a,b} , Paraguay ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | Australia ^{**a} , Venezuela ^a |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>glabriuscula</i> | Argentina ^{a,b} | África ^{**a} |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>pampeana</i> | Argentina ^{a,b} | |
| <i>N. linariifolia</i> var. <i>pinifolioides</i> | Argentina ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia micrantha</i> | Argentina ^{a,b} , Brasil ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia pinifolia</i> | Argentina ^{a,b} , Brasil ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>N. pulchella</i> var. <i>pulchella</i> | Argentina ^{a,b} , Bolivia ^a | |
| <i>N. pulchella</i> var. <i>longistyla</i> | Argentina ^{a,b} | |
| <i>N. pulchella</i> var. <i>macrocalyx</i> | Argentina ^{a,b} , Bolivia ^a | |
| <i>Nierembergia repens</i> | Chile ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia rigida</i> | Argentina ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia riograndensis</i> | Brasil ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia rivularis</i> | Argentina ^{a,b} , Bolivia ^a , Brasil ^a , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia scoparia</i> | Argentina ^{a,b} , Brasil ^{a,b} , Uruguay ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia spathulata</i> | Bolivia ^a , Colombia ^a , Ecuador ^a , Perú ^a | |
| <i>Nierembergia tandilensis</i> | Argentina ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia tucumanensis</i> | Argentina ^{a,b} | |
| <i>Nierembergia veitchii</i> | Argentina ^{a,b} | |

*Especie exótica en Nueva Gales del Sur (Australia); **Especie exótica en Botsuana, Provincia del Cabo, Estado Libre, Mozambique, Provincias del Norte y Zimbabue (África). Referencias: a = POWO (2023); b = Zuloaga et al. (2023).

Anexo II. Materiales y metodología empleados para los análisis físico-químicos de suelos

En esta sección se describen los materiales y metodología utilizados en los análisis físico-químicos de suelos llevados a cabo en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua de INIA La Estanzuela y el Laboratorio de Análisis Integral de INIA Tacuarembó.

Los datos están expresados en base a tierra muy fina, seca en estufa a 40°C y molidas con molino a martillo hasta pasar malla de 2 mm.

pH: se agita la muestra de suelo:agua (en una relación 1:2,5), acorde a Beretta A., Bassahun R., Musselli R. (2014). ¿Medir el pH del suelo en reposo o agitando la mezcla de suelo:agua? *Agrociencia* (Uruguay), 18(2):90-94.

Acidez titulable a pH = 7: se utiliza acetato de calcio bufferado a pH 7 y se determina la acidez midiendo el pH de equilibrio suelo:solución buffer, acorde a Beretta A., Bassahun D., Torres D., Musselli R., García L. (2017). Acidez titulable a pH = 7 estimada a partir del pH de una mezcla suelo:buffer. *Agrociencia* (Uruguay), 21(1):105-108.

Macronutrientes Ca, Mg, K y Na: se determinan las formas intercambiables al extraer con acetato de amonio bufferado a pH= 7 y lectura del extracto por emisión atómica (K y Na) y absorción atómica (Ca y Mg), o por emisión atómica con equipo ICP-OES. Metodología acorde a: Jackson M.L. (1964). *Análisis químico de suelos*. Ediciones Omega S.A. Barcelona, 662 p.

Micronutrientes Cu, Fe, Mn y Zn: se determinan las formas quelatizables mediante extracción con DTPA y medición del extracto por absorción atómica en fotometría de llama o medición por emisión atómica con equipo ICP-OES. Metodología acorde a: de Andrade J.C., de Abreu C.A., Ferreira de Abreu M. (2001). Determinação de cobre, ferro, manganês, zinco, cádmio, cromo, níquel e chumbo em solos usando a solução de DTPA em pH 7,3. En: Raj B. van, Andrade J.C., Cantarella H., Quaggio J.A. (2001). *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas, Instituto Agrônomo, Cap. 16, pp. 240-250.

Textura: se realizó una modificación de la técnica de Bouyoucus acorde a: Beretta A.N., Silbermann A.V., Paladino L., Torres D., Bassahun D., Musselli, R., Lamohte A.G. (2014). Soil texture analyses using a hydrometer: modification of the Bouyoucus method. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 41(2):263-271.

Carbono orgánico en suelo (ME-LE-su-01): se realizó por combustión seca de la muestra y posterior detección de CO₂ por infrarrojo. El método de ensayo del laboratorio se ajusta a Wright A.F., Bailey J.S. (2001). Organic carbon, total carbon, and total nitrogen determinations in soils of variable calcium carbonate contents using a Leco CN-2000 dry combustion analyzer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32:3243-3258; y se encuentra validado en base a la Norma ISO:10694. Soil quality-determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis).

Carbono inorgánico: valores de pH inferiores a 7,2 permiten asumir que no hay presencia de carbonatos, por lo cual se reporta C inorgánico = 0 %. Para valores de pH mayores a 7,2, cuando el análisis cualitativo no indica presencia de carbonatos se reporta C

inorgánico = 0 %. La determinación cuantitativa de C inorgánico se realiza y se reporta cuando la muestra de suelo tiene pH mayor que 7,2 y el análisis cualitativo indica presencia de carbonatos.

P ácido cítrico: extracción con solución de ácido cítrico al 0,5% en relación suelo: extractante 1:10, y posterior determinación del P extraído mediante absorbancia (882 nm) del complejo molibdofosfato reducido; acorde a: Bray R.H., Kurtz L.T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci 59:39-45; con modificación en la concentración de ácido sulfúrico.

Nitrógeno total: combustión a 900°C y posterior detección de N₂ por conductividad térmica

Equipos:

- ICP-OES PerkinElmer Optima 7300 DV
- Espectrofotómetro de absorción atómica PerkinElmer AA700 con horno de grafito
- Analizador Elemental LECO, modelo Truspec CNS
- Analizador elemental LECO, modelo CHN 628
- Espectrofotómetros V/UV
- Potenciómetros con sondas específicas

Anexo III. Materiales y metodología empleados para la cuantificación de vitamina D₃ y sus derivados hidroxilados

En este Anexo se describen los materiales y la metodología empleados para la cuantificación de vitamina D₃ y sus derivados hidroxilados en muestras de material vegetal en el Laboratorio de Agroalimentos de INIA Las Brujas.

Materiales y reactivos:

- Tubos cónicos tipo Falcon de 15 mL
- Microtubos Eppendorf 2 mL
- Pipetas automáticas Thermo Scientific 100-1000 µL y 1,0-10-0 mL con sus tips correspondientes
- Reactivos y/o disolventes para la extracción: hexano, acetato de etilo, agua destilada, etanol absoluto, metanol, antioxidantes butilhidroxitolueno (BHT), ácido L-ascórbico ($\geq 99.0\%$, cristalino), hidróxido de potasio (para análisis ACS, forma de pellets)
- Estándares (proveedor Med Chem Express, fecha de remisión 22/08/22, conservados a -20°C protegidos de la luz):
 - Estándar de vitamina D₃ (colecalfiferol), CAS 67-97-0
 - Estándar de calcifediol (25-hidroxicolecalciferol), CAS 19356-17-3
 - Estándar de calcitriol (1-alfa,25-dihidroxicolecalciferol), CAS 32222-06-3
- Perlas para disrupción de tejidos vegetales (acero inoxidable, tamaño 2,0 m)
- Tanque de N₂ líquido
- Jeringas de plástico
- Filtros de jeringas 0,22 µm
- Viales vidrio ámbar y tapones con septos de silicona de PTFE

Equipos:

- Balanza analítica RADWAG AS 220.R2
- Disruptor celular digital Bead Genie Scientific Industries, 4800 golpes por minuto (2400 rpm)
- Sistema UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 (columna Phenomenex Luna 5 µm C18 150x4,6 mm, precolumna Phenomenex C18 4x3,0 mm), con detector de arreglo de diodos (DAD), y Software Chromeleon 7.0
- Concentrador de vacío Centriva™ LABCONCO
- Centrífuga refrigerada
- Estufa de secado
- Vortex
- Baño de ultrasonidos
- Bomba de vacío

Método de extracción:

1. Se pesan 500 mg de muestra de planta (previamente secada en estufa a una temperatura de 30°C durante 24 h y pulverizada con N₂ líquido, pesar antes y

- después de la estufa para determinar el porcentaje de humedad) en un tubo Falcón de 15 mL.
2. Se le adicionan 0,01 g de ácido ascórbico, 1 mL de agua destilada, 1,4 mL de una solución de EtOH (con 0,2% de BHT) y 600 µL de una solución de KOH en MeOH 4%*m/v*.
 3. Se le adiciona 4 mL de una mezcla de acetato de etilo: hexano (4:6).
 4. Se lleva al disruptor por 3:30 minutos, velocidad 4800 golpes por minuto.
 5. Se centrifuga durante 10 minutos (8000 rpm, temperatura 5°C).
 6. Se toma la fase de acetato de etilo: hexano (superior) y se lleva a sequedad los Eppendorf en el Centrivap (durante 60 minutos en un programa con temperatura 30°C).
 7. Se retoma la muestra en 500 µL de EtOH. Homogeneizar en vortex durante unos segundos y en sonicador durante otros segundos. Se filtra la muestra en filtro 0,22 µm.
 8. Se trasvasa a vial color ámbar y se dispone en el autosampler para inyección en el UHPLC.

Condiciones del método de análisis por UHPLC:

- Fase móvil:
 - A: Acetonitrilo
 - B: Metanol
 - C: Agua ultrapura
 - D: THF
- Temperatura de la columna: 25°C
- Volumen de inyección: 20 µL
- Detector: modo UV (longitud de onda múltiple), a 254 nm (UV1), 265 nm (UV2) y 280 nm (UV3)

Gradiente:

| Tiempo (min) | Flujo (mL/min) | %A | %B | %C | %D |
|--------------|----------------|------|-----|------|-----|
| 0,0 | 1,0 | 17,0 | 5,0 | 70,0 | 8,0 |
| 3,9 | 1,0 | 17,0 | 5,0 | 70,0 | 8,0 |
| 4,0 | 1,0 | 22,0 | 0,0 | 70,0 | 8,0 |
| 9,7 | 1,0 | 22,0 | 0,0 | 70,0 | 8,0 |
| 9,8 | 1,0 | 17,0 | 5,0 | 70,0 | 8,0 |
| 13,0 | 1,0 | 17,0 | 5,0 | 70,0 | 8,0 |