



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Optimización de *Tithonia diversifolia* ensilada como alimento para ovinos de pelo

Vilma Amparo Holguín Castaño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia
2016

Optimización de *Tithonia diversifolia* ensilada como alimento para ovinos de pelo

Vilma Amparo Holguín Castaño

Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar por el título de:

Doctor en Ciencias Agrarias

Directores:

Sanín Ortiz Grisales, Ph.D.

Mario Cuchillo Hilario, Ph.D

Línea de Investigación:

Producción Animal Tropical

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia

2016

Dedico

A mi madre, que siempre será mi orgullo por el ejemplo y tenacidad que ha mostrado en la vida. Ella siempre nos guio hacia el camino del éxito, gracias.

A mi padre, que siempre nos dio ejemplo de un infinito amor, siempre estuvo orgulloso de los progresos de sus hijos. Sé que aunque ya no está con nosotros, su apoyo es eterno.

A mi hijo, que es la luz de mi vida por el cual vale la pena luchar y seguir viviendo, este título va dedicado a él con el inmenso deseo que sea su ejemplo en la vida.

A mi esposo, quien me dio fuerzas, ánimo y apoyo incondicional para que iniciara y culminara mis estudios. Sin él no hubiera sido posible este logro.

A mis hermanos y hermana, que siempre están allí, incondicionales en todos los sentidos. Sin ellos la vida no tendría sentido.

A mi sobrina, que ha sido un apoyo incondicional en todo mi proceso. Ella lo sabe.

A mi sobrino, Camilo, que sabe tiene mi apoyo incondicional siempre.

A María Isabel "Chava", por el apoyo brindado en el proceso de mis estudios. Apoyo que me permitió más dedicación a los mismos.

A Dios, que nunca me ha fallado.

Agradecimientos

La autora expresa sus agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, a la Universidad del Tolima por su gran apoyo en la realización de sus estudios, al Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT por su valioso aporte en la ejecución de este trabajo. Además agradece a las siguientes personas sin las cuales hubiese sido muy difícil la consecución de este trabajo y las que hicieron un gran aporte a la formación personal y profesional:

- Dr. Sanín Ortiz Grisales por su orientación y apoyo en este trabajo.
- Dra. Siriwan Martens quien fue la persona que me ayudó en el CIAT al inicio de este trabajo, y durante todo el proceso en la estructuración del mismo al igual que en la revisión de algunos de los artículos.
- Dr. Mario Cuchillo quien durante su estadía en el CIAT me brindó su colaboración para la ejecución del mismo y siempre ha estado pendiente de la escritura de los artículos.
- M.Sc. Patricia Ávila, quien siempre me brindó su amistad incondicional sobre todo en los momentos más difíciles, inmenso agradecimiento.
- Dr. Peters Michael, por su ayuda para la realización de este trabajo.
- Dr. Jacobo Arango, por su colaboración en la culminación del mismo.
- Dra. Luz Stella Muñoz Arboleda, por su amistad, contribución y enseñanza en este proceso.

- Orlando Trujillo, quien además de brindarme su apoyo incondicional, mostró su voluntad y buena disposición siempre para lo que se requería, gracias por su amistad.
- Jairo Soto, quien fue un gran pilar en el trabajo de respuesta animal, gracias por poder contar con su valiosa ayuda.
- A Johanna Mazabel, Stieven Quintero, Alex Hincapié del laboratorio de forrajes del CIAT, sin los cuales no hubiese podido tener éxito en la investigación. Gracias por todo.
- Belisario Hincapié por su ayuda y disposición en todo momento.
- M.Sc. Armando Zapata Director de CEUNP, gracias su aporte en la siembra del cultivo de *Tithonia diversifolia*. Gracias.
- A los trabajadores del CEUNP, porque siempre estuvieron dispuestos a lo que se necesitara, incluso en las madrugadas de domingo para fertilizar y regar el cultivo.

Resumen

Se prevé que la disponibilidad de forraje va a contar con mayores fluctuaciones en los próximos años debido al cambio climático. Por tal motivo, es de gran importancia estudiar las opciones forrajeras en la alimentación de rumiantes. Mejorar el ensilado de forrajes tropicales supone una estrategia adecuada para hacer frente a la escasez de alimentos durante las estaciones secas prolongadas en el trópico. Este estudio tuvo como objetivo analizar el valor nutricional del ensilaje de *Tithonia diversifolia* (TD) sólo o en mezcla con *Pennisetum purpureum* (PP) para optimizar su desempeño como alimento para ovinos de pelo.

En un primer ensayo, se evaluó la respuesta productiva forrajera de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (TD), provenientes de varias localidades del centro occidente de Colombia, establecidas en una colección en el Centro Experimental Universidad Nacional sede Palmira (CEUNP) Candelaria (Colombia). Coordenadas 2°06' N y 65°03' O, con temperatura de 26°C y precipitación promedio anual de 1532 mm. Se evaluaron indicadores morfo agronómicos y nutricionales de las 44 introducciones; se clasificaron mediante estadística multivariada y la posterior aplicación de dos índices (Índice de Potencial Forrajero Ponderado e Índice de Rendimiento y Calidad Ponderado). Se seleccionaron las ocho introducciones de mayor producción de biomasa y de mejor calidad nutricional.

En dos experimentos, realizados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) se evaluó el material vegetal de TD más rendidor, con el cual se hicieron evaluaciones de TD ensilada en mezcla con *Pennisetum purpureum* (PP). La utilización de TD como ensilaje es factible por su alta ensilabilidad derivada de la acción de la bacterias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus paracasei* presentes en el inoculo T735. Sin embargo, el aumento de la proporción de PP en las mezclas mejoró una acidificación más rápida (menor pH). Se prepararon microsilos de 1 Kg, los cuales fueron abiertos a los 90 días y

sometidos a una prueba de estabilidad aeróbica, evidenciándose un efecto tampón de TD en el período de exposición aeróbica, por lo tanto, una mayor estabilidad en los ensilajes con una mayor proporción de TD.

En un experimento de cinética ruminal *in vitro*, se midió la degradación de la MS y la producción de gas. Una ecuación de Gompertz se utilizó para modelar la acumulación de gas de diferentes tratamientos de la mezcla TD/PP: (T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100). El gas acumulado a las 144 horas en T1 (161.16 ml) tuvo diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) en comparación con los otros tratamientos. Un aumento de la producción de gas se encuentra en T4 (0/100) a las 144 h (204.1 ml). Los resultados de mezcla TD/PP indican que los ensilajes preparados con una mayor inclusión de TD, independiente de la inoculación BAL, producen menos gas, que oscila entre 161.2 y 174.45 ml/g, la mayor tasa de producción de gas fue en T4 y T3 con 3.34, 3.20 ml/h, respectivamente. Los valores más bajos (3.03 y 3.09 ml/h) fueron reportados para los tratamientos con mayor proporción de TD, respectivamente.

Seguidamente, se evaluó el patrón de fermentación ruminal y la liberación de metano (CH_4) en el modelo RUSITEC, utilizando como ensilaje control PP al 100% (T1) versus ensilaje de una mezcla (PP: 67%/TD 33% TD) enriquecido, o no, con BAL como aditivo: T2, sin aditivo; T3, *Lactobacillus paracasei* T735; T4 inóculo comercial SIL-ALL^{®4x4}. Ambos se aplicaron en una concentración de 10^8 ufc / 0,1 ml.kg⁻¹ en una solución de Ringer. Se hizo un suministro diario de MS para mantener constante el flujo en el sistema y evaluar los cuatro tratamientos durante un periodo de ocho días. Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar. No hubo efecto de los tratamientos (T2, T3 y T4) versus control (T1) en la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ ($p > 0.05$). En comparación con el control, T4 redujo el CH_4 , liberando 1.36 y 2.43 (mmol/g), respectivamente ($p < 0.05$), sin embargo, T3 también presentó una reducción importante. La reducción de la población de protozoos ciliados no mostró diferencias ($p > 0.05$).

Finalmente, se realizó un ensayo para evaluar el efecto en la ganancia de peso vivo en ovinos alimentados con ensilajes de PP al 100% (T1), comparado con la mezcla PP al 67% (PP 67%/ TD 33%; T2). Se emplearon 10 ovinos mestizos de razas tropicales (Dorper, Catadine, Santa Ines) destetados de tres meses de edad y peso promedio de 23 kg. Los ensilajes se suministraron como ración base durante 61 días (T1 5,97 kg de

ensilaje/animal /día y T2 5,74 kg/animal/día) y se suministró un complemento energético de harina de arroz (277 g/animal) y sal mineral a voluntad. La ganancia diaria de peso fue positiva con 55 g/animal/día para el tratamiento T2, respecto a una ganancia negativa para T1. Se concluye que la dieta de ensilaje de la mezcla 67% (PP 67% / TD 33%; T2) en ovinos incrementa el peso corporal a niveles de suplementos de alta calidad proteica

Palabras clave: Agronomía; Inóculos; capacidad buffer; Digestibilidad; pequeños rumiantes

Abstract

It is anticipated that the availability of forage will have greater fluctuations in the coming years due to climate change. Therefore, it is of great importance to study the forage options in ruminant feed. Improving silage tropical forages is a suitable strategy to tackle food shortages during prolonged dry seasons in the tropics. This study aimed to analyze the nutritional value of silage *Tithonia diversifolia* (TD) alone or in mixture with *Pennisetum purpureum* (PP) to optimize their performance as feed for sheep hair.

In a first test, the forage production response of 44 introductions of *Tithonia diversifolia* (TD), from various locations in central western Colombia, were established and evaluated at the headquarters of the Centro Experimental de la Universidad Nacional - Palmira (CEUNP), Candelaria (Colombia). Coordinates 2°06' N and 65°03' W, with a temperature of 26°C and average annual precipitation 1532 mm. Morphoagronomic and nutritional indicators of the 44 introductions were assessed and classified by multivariate statistics and subsequent application of two indices: Weighted Forage Potential Index and Weighted Performance and Quality Index. The eight TD introductions with the highest biomass yielding and the best nutritional quality were selected.

In two experiments, performed at the International Center for Tropical Agriculture (CIAT), the plant material of TD mixed with PP were made. Use of TD as silage is feasible. High ensilability of TD derived from the action of lactic acid bacteria *Lactobacillus paracasei* T735 present in the inoculum was observed. However, increasing the proportion of PP in the blends improves a rapid drop in pH of silages. Microsilos (1kg) were prepared, which were opened after 90 days and were subjected to a test of aerobic stability. The buffer effect of TD was remarkable during the period of aerobic exposure, providing greater stability of silages in terms of acidity after opening the silo.

In vitro ruminal kinetics of dry matter and gas production was measured. Gompertz equation was used to model the accumulation of gas mixture of different treatments TD/PP:

(T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100). The gas accumulated at 144 hours in T1 (161.16 ml) had statistical differences ($P < 0.0001$) compared to other treatments. Increased gas production is in T4 (0/100 TD/PP) at 144 h (204.12 ml) was observed. The results of mixture TD/PP indicate that silages prepared with larger inclusion of TD, independent of the LAB inoculation, produced less gas, ranging from 161.2 to 174.45 ml/g. The highest rate of gas production was in T4 and T3 with 3.34 and 3.20 ml/h, respectively. The lowest values were reported for T1 and T2 treatments with higher proportion of TD (3.03 and 3.09 ml/h, respectively).

The pattern of ruminal fermentation and methane release in the RUSITEC model, using as silage PP (100%) control (T1) versus silage a mixtures (PP 67% / TD 33%; T2) supplemented or not with additives were evaluated as follows: T2, no additive; T3, T735 *Lactobacillus paracasei*; T4 SIL-ALL^{®4x4} commercial inoculum. Both were applied in a concentration 10^8 ufc / 0,1 ml.kg⁻¹ in a solution of Ringer. A daily supply of dry matter was made to maintain constant flow in the system and evaluate the four treatments over a period of eight days. The data were analyzed using a completely randomized design. There was no effect of treatments (T2, T3 and T4) versus control (T1) in the concentration of NH₃-N ($p > 0.05$). Compared to control, T4 reduced methane, releasing 1.36 to 2.43 (mmol/g), respectively ($p < 0.05$). However, T3 also showed a significant reduction. The reduction of the population of ciliated protozoa showed no difference ($p > 0.05$).

A trial was conducted to evaluate the effect on body weight gain in sheep fed silage PP (100%, T1), compared with the mixture of PP 67% (PP 67% / TD 33%; T2). 10 mestizos tropical sheep breeds (Dorper, Katahdine, Santa Ines) weaned at three months of age and average weight of 23kg were used. Silages were supplied as a base ration for 61 days (T1 5.97 kg of silage / animal and T2 5.74 kg / animal) and an energy supplement rice flour (277 g/animal in each treatment) and salt mineral will be provided. The daily weight gain was positive with 55 g / animal / day for treatment T2, compared to a negative gain for T1. It is concluded that the diet of silage mix T2 (PP 67% / TD 33%) increased sheep body weight as high quality protein supplements.

Keywords: Agronomy; inoculants; buffer capacity; digestibility; small ruminants

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIX
Lista de tablas	XXI
Lista de abreviaturas.....	XXIII
Introducción General	1
Identificación del Fenómeno de Estudio	1
Problema de Investigación	4
Hipótesis Asociadas al Problema de Estudio	5
Objetivos.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos	6
Referencias.....	6
1. Revisión de Literatura.....	9
1.1 Descripción Botánica y Taxonómica	9
1.2 Distribución y Usos	10
1.3 Contenido Nutricional.....	11
1.3.1 Ensilaje de <i>T. Diversifolia</i>	12
1.3.2 Uso de Aditivos para Mejorar la Eficiencia de Ensilaje	13
1.4 Ensayos in Vitro.....	13
1.5 Referencias	15
2. Evaluación multicriterio de 44 introducciones de <i>Tithonia diversifolia</i> (hemsl.) Gray en Candelaria, Valle del Cauca.....	23
Resumen	23
Abstract.....	24
2.1 Introducción	25
2.2 Materiales y Métodos.....	27
2.2.1 Material Biológico.....	27

2.2.2	Análisis Estadístico	32
2.3	Resultados y Discusión	33
2.3.1	Análisis Multivariado	33
2.4	Conclusiones.....	41
2.5	Referencias	42
3.	Estimation of leaf area of <i>Tithonia diversifolia</i> using allometric equations.....	47
Abstract	47
Resumen	48
3.1	Introduction	48
3.2	Materials and Methods	50
3.3	Statistical Analysis.....	52
3.4	Results	53
3.4.1	Discusion	56
3.5	Conclusions.....	57
3.6	References.....	58
4.	<i>In-vitro</i> assessment for ensilability of <i>Tithonia diversifolia</i> alone or with <i>Pennisetum purpureum</i> using epiphytic lactic acid bacteria strains as inocula.....	61
Abstract	61
Resumen	62
4.1	Introduction	63
4.2	Materials and Methods	64
4.2.1	Forages and Experimental Design	64
4.2.2	Chemical Analysis	65
4.2.3	Statistical Analyses.....	66
4.3	Results	66
4.4	Discussion.....	69
4.5	Conclusion	71
4.6	References.....	72
5.	Estabilidad aeróbica del ensilaje de <i>Pennisetum purpureum</i> con diferentes niveles de inclusión de <i>Tithonia diversifolia</i>.....	75
Resumen	75
Abstract	76
5.1	Introducción.....	76
5.2	Materiales y Métodos	78
5.2.1	Análisis Estadístico.....	79
5.3	Resultados	80
5.3.1	Análisis Químico	80
5.4	Conclusiones.....	90
5.5	Referencias	91

6. Inclusion level of <i>Tithonia diversifolia</i> on fermentative parameter and nutritional quality of <i>Pennisetum purpureum</i> silage enriched or not with lactic acid bacteria strains	95
Abstract.....	95
Resumen.....	96
6.1 Introduction.....	97
6.2 Material and Methods	100
6.2.1 Plant Material	100
6.2.2 Silage Preparation.....	100
6.2.3 Nutritive Value.....	102
6.2.4 <i>In Vitro</i> Gas Production	102
6.2.5 Statistics Design.....	104
6.3 Results	105
6.3.1 Nutritive Value.....	105
6.3.2 Gas Production	106
6.3.3 Methane Release	110
6.4 Discusion	111
6.5 Conclusions	114
6.6 References	115
7. Efecto de la mezcla ensilada de <i>Penisetum purpureum</i> y <i>Tithonia diversifolia</i> sobre la fermentación ruminal <i>in vitro</i> y su emisión de metano en el sistema RUSITEC	121
Resumen.....	121
Abstract.....	122
7.1 Introducción	123
7.2 Materiales y Métodos.....	125
7.2.1 Determinación de pH y Potencial Redox	127
7.2.2 Recuento de Protozoarios	128
7.2.3 Determinación de Metano	128
7.3 Resultados y Discusión.....	128
7.3.1 Características del Líquido Ruminal	130
7.3.2 Degradación de la Materia Seca	132
7.3.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGV).....	133
7.3.4 Nitrógeno Amoniacal (NH ₃ -N).....	134
7.3.5 Emisión de Metano	135
7.4 Conclusiones	138
7.5 Referencias	138
8. Ganancia de peso en ovinos alimentados con un ensilaje de <i>Pennisetum purpureun</i> y <i>Tithonia diversifolia</i>.....	145
Resumen.....	145
Abstract.....	146
8.1 Introducción	146
8.2 Materiales y Métodos.....	148
8.2.1 Elaboración del Ensilaje.....	150

8.2.2	Análisis Estadístico	152
8.3	Resultados y Discusión	153
8.4	Conclusiones.....	156
8.5	Referencias	156
9.	Conclusiones Generales	161

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 2-1. Análisis biplot para 44 introducciones de <i>T. diversifolia</i>	35
Figura 2-2. Dendrograma de las 44 introducciones de <i>T. diversifolia</i> analizadas por análisis de conglomerados.....	36
Figura 2-3. IRCP para ocho introducciones de <i>T. diversifolia</i> evaluadas en el Valle del Cauca.....	41
Figura 3-1. Scheme representing how linear measurements were made length and width of leaves at <i>Tithonia diversifolia</i>	52
Figura 3-2. Estimated and measured leaf area (LA) for plants of <i>Tithonia diversifolia</i> (R2: 0.89).....	55
Figura 5-1. Temperatura ambiente y en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de <i>Pennisetum purpureum</i> en mezcla con <i>Tithonia diversifolia</i>	85
Figura 5-2. Variación térmica en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de <i>Pennisetum purpureum</i> en mezcla con <i>Tithonia diversifolia</i>	86
Figura 6-1. Fractional gas production rate per hour incubated <i>T. diversifolia</i> and <i>P. purpureum</i> mixture silages	107
Figura 6-2. Fractional gas production rate per hour inoculum incubated with silage without inoculant LAB	108
Figura 6-3. Predicted cumulative gas production of <i>T. diversifolia</i> (TD) and <i>P. purpureum</i> (PP) mixture silages per gram of incubated organic matter	110
Figura 7-1. Acidez del rumen simulada en RUSITEC durante los 8 días después del inicio de la fermentación.....	131
Figura 7-2. Potencial redox simulado en RUSITEC durante los 8 días después del inicio de la fermentación.....	132
Figura 7-3. Degradación de la materia orgánica simulada en RUSITEC durante los 8 días después del inicio de la fermentación.....	133

Figura 8-1. Corral de alojamiento de ovinos durante el experimento (Holguín 2016) 149

Figura 8-2. Consumo de materia seca diaria y peso vivo en ovinos alimentados con *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia*..... 154

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Procedencia de introducciones de <i>T. diversifolia</i> del sur occidente de Colombia	28
Tabla 2-2. Medidas de tendencia central y dispersión del análisis univariado de introducciones (n = 44) de <i>T. diversifolia</i> evaluadas en Candelaria, Valle del Cauca.....	33
Tabla 2-3. Características físicas y productivas de 44 introducciones de <i>T. diversifolia</i> clasificadas en tres conglomerados y evaluadas en el Valle del Cauca.....	38
Tabla 2-4. Introducciones seleccionadas del conglomerado 1 bajo aplicación de un índice de Potencial Forrajero Ponderado.....	38
Tabla 2-5. Características físicas, productivas y de calidad de ocho introducciones de <i>T. diversifolia</i> evaluadas en el Valle del Cauca.....	40
Tabla 3-1. Descriptive statistics of actual area and long dimensions, width and their combinations in <i>Tithonia diversifolia</i> leaves	53
Tabla 3-2. Equations and statistical estimators derived from the analysis of correlation between the actual area and long dimensions, width and their combinations in <i>Tithonia diversifolia</i> leaves	56
Tabla 4-1. Chemical composition (DM base) of <i>Tithonia diversifolia</i> and <i>Pennisetum purpureum</i> evaluated in the Rostock Fermentation Test.....	67
Tabla 4-2. Acidification potential of epiphytic strains isolated from <i>Tithonia diversifolia</i> (TD) against a blend of lactic acid-fermenting bacteria (BLB)* inoculum enriched with sucrose (S) in a preliminary test.....	68
Tabla 4-3. Development of pH during the Rostock Fermentation Test (RFT) for <i>Tithonia diversifolia</i> (TD) using different epiphytic lactic acid bacteria strains enriched with sucrose (S) in experiment 1.....	68

Tabla 4-4. Development of pH during the Rostock Fermentation Test for <i>Tithonia diversifolia</i> alone or with <i>Pennisetum purpureum</i> using different lactic acid bacteria strains in experiment 2.	71
Tabla 5-1. Clave para indicadores organolépticos según grado de alteración de la calidad de ensilajes.....	80
Tabla 5-2. Valor nutritivo de ensilaje de mezclas de <i>T. Diversifolia</i> y <i>P. purpureum</i>	82
Tabla 5-3. Distribuciones de las diferentes características organolépticas de microensilajes	83
Tabla 5-4. ANAVAM: Prueba de Hotelling con nivel corregido por Bonferroni (Alfa = 0.05)	84
Tabla 5-5. Variación de la MS en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de <i>Penisetum purpureum</i> en mezcla con <i>Tithonia diversifolia</i>	87
Tabla 5-6. Variación del pH en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de <i>Penisetum purpureum</i> en mezcla con <i>Tithonia diversifolia</i>	89
Tabla 6-1. Nutritive value of <i>T. Diversifolia</i> and <i>P. purpureum</i> silage mixture	106
Tabla 6-2. Cumulative gas production of <i>T. diversifolia</i> (TD) and <i>P. purpureum</i> (PP) mixture silages per gram of incubated organic matter.....	109
Tabla 6-3. Parameter Gompertz model for the production of gas observed at different levels of inclusion of <i>T. diversifolia</i> in <i>P. purpureum</i> silage	110
Tabla 6-4. Methane production per gram of dry matter silage incubated at different levels of inclusion of TD. /PP.....	111
Tabla 7-1. Tratamientos analizados en el proceso de digestión en microsilos	126
Tabla 7-2. Composición bromatológica de los ensilajes analizados antes de RUSITEC (valores expresados como porcentaje de la materia seca).....	130
Tabla 7-3. Efecto de diferentes dietas de la mezcla <i>Pennisetum purpureum</i> y <i>Tithonia diversifolia</i> sobre la fermentación <i>in vitro</i> en el rumen.....	136
Tabla 8-1. Pesajes de los animales antes del periodo experimental para la evaluación de dietas de <i>Pennisetum purpureum</i> solo y en mezcla con <i>Tithonia diversifolia</i>	150
Tabla 8-2. Análisis bromatológico de las dietas suministradas a los ovinos de pelo.....	152
Tabla 8-3. Parámetros productivos en ovinos de pelo sometidos a dos dietas ensiladas de <i>Pennisetum purpureum</i> y <i>Tithonia diversifolia</i>	155

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
AC	Análisis de componentes
ACP	Análisis de componentes principales
AD	Área Dosel
AF	Área Foliar
AGV	Ácidos grasos volátiles
BC	Buffering capacity
BIC	Bayesian information criterion
BLB	Blend of lactic acid-fermenting bacteria
BMS	Biomasa en materia seca
BS-T	Bosque Seco Tropical
CEUNP	Centro Experimental universidad Nacional Palmira
CH ₄	Metano
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CT	Condensed tannins
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
FC	Fermentation coefficient
FDA	Fibra detergente ácida
FDN	Fibra detergente neutra
GEI	Gases de Efecto de Invernadero
HD	Altura de dosel
HD	Altura de Dosel
HPI	Maximum time the inflection point
HT	Relación Hoja Tallo
IPFP	Índice potencial forrajero ponderado
IRCEP	Índice de Rendimiento y Calidad Estandarizado Ponderado
IVDDM	<i>In vitro</i> digestibility
L	Longitud
LAB	Lactic acid bacteria
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
MSE	Bean squared error

NH ₃ -N	Nitrógeno amoniacal
P/ha	Productividad/hectárea
PC	Proteína cruda
PEA	Período de exposición aeróbica
PP	<i>Pennisetum purpureum</i>
RFT	The Rostock Fermentation Test
RS	Ramas por sitio
RUSITEC	Artificial Rumen Simulation System
TAC	Tasa de Crecimiento
(TD)	<i>Tithonia diversifolia</i>
(TD) /PP	<i>Tithonia diversifolia/Pennisetum purpureum</i>
VRF	Valor Relativo Forrajero
W	Ancho
WSC	Water soluble carbohydrates

Introducción General

Identificación del Fenómeno de Estudio

Los sistemas de producción animal extensivos han sido acusados de ser causantes de la degradación ambiental, de la deforestación, erosión del suelo, emisión de gases de efecto invernadero (GEI) y distribución inequitativa de la tierra especialmente en la zona neotropical (Belli, Tekelenburg & Siria, 2009; Mora-Delgado & Holguín, 2009; Steinfeld, Gerber, Wassenaar, Castel, Rosales, Haan, 2006).

Por otra parte, los productores en el neo trópico usualmente usan dietas para rumiantes basadas en gramíneas, las cuales presentan limitaciones nutricionales que se traducen en un bajo consumo de nutrientes digeribles debido a una fermentación microbiana deficiente que se refleja en un flujo y una absorción de nutrientes inferior a la que requieren los rumiantes (Bernal, 2007). Ante esto, algunos recurren al uso de suplementos (Lazcano, 1996), a la asociación de las gramíneas con leguminosas (Hess, Monsalve, Lascano, Carulla, Díaz & Kreuzer, 2003) o a la introducción de leguminosas arbustivas en sistemas silvopastoriles o bancos forrajeros (Abreu, Carulla, Kreuzer, Lascano, Díaz, Cano & Hess, 2003).

Con la suplementación se incrementa la oferta de nitrógeno (N) en el rumen para inducir la actividad microbiana, mejorando la degradación de los forrajes (Bernal, 2007), aunque esto implica un aumento de la emisión de CH₄ (Hess et al., 2003). Sin embargo, este incremento del CH₄ podría verse contrarrestado por el suministro de una dieta mixta de gramíneas y un follaje de una planta tanífera (Bernal, 2007).

Así, se necesita desarrollar sistemas de producción basados en estrategias alimentarias que sean adoptadas por los productores para reducir el impacto negativo sobre el ambiente y mejorar la eficiencia de uso de recursos naturales en los sistemas de producción, en aras

de reducir el efecto estacional, causante de épocas de escasas de forraje, reducir la producción y así contribuir a mejorar el nivel de vida de los productores pecuarios (Mendieta-Araica, 2011) y disminuir la producción de GEI (Bernal, 2007).

Especialmente en la zona de vida bosque seco tropical (bs-T), la alimentación de rumiantes presenta serias limitaciones por la escasez de oferta forrajera durante la temporada de sequía (Fuyisaka, Holmann, Peters, Schmidt, Burgos, Mena, Posas, Cruz, Davis & Hincapié, 2005; Holmann, Rivas, Angel & Pérez, 2004).

El estrés hídrico que incide en el deterioro de los forrajes, afectando la calidad por una alta lignificación de las paredes celulares, afecta la digestibilidad en general y la reducción de la disponibilidad proteica (Rúa, 2007). De igual forma hay una dependencia de los sistemas de alimentación de rumiantes de un reducido número de especies vegetales, desaprovechando el valor nutritivo de la diversidad de especies presentes en los ecosistemas tropicales y que actualmente están siendo subutilizadas (Rosales, 1999), lo cual despierta el interés por la investigación con especies no convencionales que tienen potencial forrajero y cuya oferta de nutrientes puede diferirse a través del año, especialmente para las épocas de escasas (Holguín, 2005; Wattiaux, 2000).

Para ello, las técnicas de conservación basadas en la fermentación anaeróbica constituyen una estrategia de conservación y optimización de los nutrientes (González, 1994). Una de estas especies es *Tithonia diversifolia*, la cual ha demostrado versatilidad en el manejo como forraje fresco, pero hay evidencias preliminares que mejora su calidad mediante procesos de ensilado (Fasuyi & Ibitayo, 2011).

Es urgente realizar trabajos de investigación que desarrollen las potencialidades del valor nutritivo y las propiedades de especies forrajeras promisorias, como es el caso de *Tithonia diversifolia*. Esta especie ha sido estudiada por varios investigadores en su distribución (Gómez & Rivera 1987; Ruiz, Torres, Febles, Díaz & González, 2012; Zapata & Silva, 2010), taxonomía y aspectos fenológicos (Otusanya & Ilori, 2012; Olabode, Adesina, Ajibola, 2010; Muoghalu, 2010), desempeño agronómico (Achieng, Ouma, Odhiambo & Muyekho, 2010) y nutricional (Fasuyi & Ibitayo, 2011). No obstante, aún hay vacíos de conocimiento, especialmente sobre la optimización del forraje mediante procesos de conservación como el ensilaje y de cómo mejorar la dinámica microbiana en el proceso de

fermentación para aumentar la eficiencia del ensilaje y la respuesta fisiológica y zootécnica de los animales que la consumen.

Este texto está organizado en nueve capítulos, en los cuales se desarrollan diferentes temas alrededor de los objetivos específicos propuestos en la tesis. Se comienza con una introducción general que contextualiza al lector, en lo referente a la importancia de la especie estudiada en relación a la búsqueda de modelos alternativos de alimentación. Se inicia con una breve explicación del fenómeno de estudio, en el cual expone el manejo que se le da a los sistemas extensivos de producción y las consecuencias ambientales que estos han ocasionado.

Se presentan argumentos de las ventajas de usar mezclas de especies de gramíneas, leguminosas o especies de arbustivas que pueden mitigar los impactos negativos sobre el ambiente y al mismo tiempo ayudan a mejorar las condiciones de producción. Se analiza, la posibilidad de conservar las características nutricionales de los forrajes, mediante estrategias de conservación que pueden ser mejoradas mediante el uso de cepas nativas aisladas del forraje en comparación con inoculos comerciales. Se argumenta sobre la necesidad de estudiar el nivel óptimo de sustitución de *Pennisetum purpureum* por *Tithonia diversifolia*. El capítulo introductorio, finaliza proponiendo el problema de estudio, las hipótesis asociadas al problema y los objetivos propuestos del trabajo.

En el capítulo uno se hace una revisión de literatura de *T. diversifolia* en aspectos como la descripción botánica y taxonómica, distribución, uso, contenido nutricional y utilización como ensilaje de esta especie. Se hace un rastreo de información sobre el uso de aditivos para mejorar la conservación de los ensilajes y la pertinencia de los ensayos *in vitro*.

En el capítulo dos se presenta la evaluación multicriterio de 44 Introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en Candelaria Valle del Cauca. Coordenadas 2°06' N y 65°03' O, con temperatura de 26°C y precipitación promedio anual de 1532 mm. Esta información se es complementada con los resultados del capítulo tres, donde se hace una estimación del área foliar de *Tithonia diversifolia* utilizando ecuaciones alométricas.

En el capítulo cuatro se hace una evaluación *in vitro* de esta especie sola o en asociación con *Pennisetum purpureum* y el uso de cepas de bacterias epifitas como inóculos. En el

capítulo cinco se realiza la evaluación de la estabilidad aeróbica del ensilaje de esta mezcla en sus diferentes niveles de sustitución. Posteriormente, en el siguiente capítulo seis se presenta la evaluación del efecto del nivel de inclusión de *Tithonia diversifolia* en los procesos de fermentación y la calidad nutricional del ensilado enriquecido o no con cepas BAL. En el capítulo siete se evaluó el efecto de esta mezcla ensilada sobre la fermentación ruminal *in vitro* y emisión de CH₄, simulada en un sistema RUSITEC

El capítulo ocho se presenta la ganancia de peso de ovinos alimentados con el mejor tratamiento de ensilaje antes evaluado en los otros capítulos y se termina con un capítulo (nueve) en el cual se hace una reflexión final sobre los elementos relevantes de esta tesis.

Problema de Investigación

Con base en la anterior identificación del objeto de estudio se formula el problema epistemológico orientado a buscar opciones de plantas forrajeras altamente productoras de biomasa para la alimentación de rumiantes y estrategias de conservación, como el ensilaje, para garantizar su disponibilidad a través del año y suplir deficiencias de alimento en épocas de escases. Así, hay que identificar procesos eficientes de acidificación que garanticen un medio ácido, en el menor tiempo.

En este orden, la precocidad de *T. diversifolia* y la versatilidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, está relacionada con una variación productiva y de calidad nutricional, por lo cual se requiere estudiar la respuesta productiva y el valor nutritivo del forraje de cultivares de diferentes procedencias geográficas de Colombia.

Una vez definidas las plantas más rendidoras y de mejor calidad nutricional, el reto consiste en conservar dichas características mediante un proceso de transformación poscosecha. El ensilaje constituye una opción de conservación, pero se requiere ampliar el conocimiento, mediante la experimentación con cepas de epifíticas aisladas del forraje de *T. diversifolia*, para comparar su rendimiento frente a inóculos probados por su capacidad acidificadora y monitorear la posterior estabilidad del ensilaje cuando este es expuesto a condiciones anaeróbicas.

Para optimizar su uso en producción animal se requiere determinar el nivel óptimo de sustitución de forraje ensilado de *T. diversifolia* en mezcla con gramíneas fibrosas, mediante la medición de la fermentación *in vitro* para simular la producción de gases, las características nutricionales y la digestibilidad del alimento.

Finalmente, se requiere probar el efecto de la inclusión de ensilaje de *T. diversifolia* en la dieta con gramíneas para ovinos de pelo, mediante indicadores de desempeño zootécnico.

Hipótesis Asociadas al Problema de Estudio

H1. Si se identifica el desempeño productivo y su valor nutricional entre introducciones de *T. diversifolia*, entonces, se podrá seleccionar aquellos genotipos con mayor valor forrajero y de productividad para estudiar su comportamiento como ensilaje.

H2. Si se logra identificar cepas nativas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de forraje de *T. diversifolia* que demuestren eficiencia acidificadora para inducir ensilabilidad entonces se podrá comparar el valor ensilado de *T. diversifolia* con aditivos comerciales y las cepas epifíticas aisladas.

H3. Si las cepas identificadas de *Lactobacillus* son eficientes en optimizar el valor integral del ensilado de *T. diversifolia*, solo o en mezcla con gramínea fibrosas, entonces se podrá probar las características nutricionales y digestibilidad *in vitro*.

H4. Si la respuesta biológica de ovinos de pelo alimentados con ensilado de *T. diversifolia* solo o en mezclas con gramíneas fibrosas es positivo, entonces se podrá incorporar en la dieta para rumiantes.

Objetivos

Objetivo General

Analizar el valor nutricional del ensilaje de *T. diversifolia* sólo o en mezcla con gramíneas voluminosas, para optimizar su desempeño como alimento para ovinos de pelo.

Objetivos Específicos

1. Evaluar las características productivas y valor nutricional de diferentes introducciones accesiones de *Tithonia diversifolia*.
2. Identificar el potencial de acidificación (pH) de inóculos nativos de *T. diversifolia* comparados con otras cepas aisladas de leguminosas y aditivos comerciales.
3. Evaluar la calidad de los ensilajes de *T. diversifolia* en mezcla con gramínea (*Penisetum purpureum*) mediante indicadores bromatológicos y de digestibilidad.
4. Simular la actividad fisiológica de la fermentación ruminal mediante la técnica *in vitro* de Rusitec
5. Verificar el mejoramiento de la respuesta productiva de ovinos de pelo alimentados con el ensilaje de *Tithonia diversifolia* comparada con dietas convencionales.

Referencias

- Abreu, A, Carulla, J.E. Kreuzer, M. Lascano, C.E., Diaz T.E. Cano, A. & Hess, H-D. (2003). Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(2),147-154.
- Achieng, J.O., Ouma, G.G., Odhiambo, G.G., & Muyekho, F.F. (2010). Effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) and inorganic fertilizers on maize yield on Alfisols and Ultisols of western Kenya. *Agriculture & Biology Journal of North America*, 1(5), 740-747.
- Belli, R., Tekelenburg, T., Siria, I. (2009). La transición hacia la sostenibilidad. Reducción del impacto futuro del sector ganadero sobre la pobreza y la biodiversidad. Managua: EDISA. 150 p.
- Bernal, L. (2007). *Efecto de las mezclas de las leguminosas Calliandra calothyrsus, Flemingia macrophylla, Cratylia argentea y Vigna unguiculata ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal in vitro y producción de leche en bovinos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 122 p. Recuperado de <https://cgspace.cqjar.org/handle/10568/66186>

- Fasuyi, A.O., & Ibitayo, F.J. (2011). Nitrogen balance and morphometric traits of weanling pigs fed graded levels of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaf meal. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition & Development*, 11(3), 1-17.
- Fujisaka, S., Holmann, F., Peters, M., Schmidt, A., Burgos, C., Mena, M., Posas, M.I., Cruz, H.... Hincapié, B. (2005). Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua. *Pasturas Tropicales*, 27(2), 73–92.
- Gómez, A. & Rivera, H. (1987). *Descripción de malezas en plantaciones de café*. Centro Nacional de Investigación en café Chinchiná (Caldas). 490 p.
- González, B. (1994). Conservación de forrajes y consideraciones técnico-económicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 11(2), 190-205.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E. & Kreuzer, M. (2003). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, 703-713.
- Holguín, V.A. (2005). Análisis comparativo y evaluación financiera de modelos de manejo nutricional en fincas de ganado de doble propósito en la zona del Pacífico Central de Costa Rica. (Tesis de maestría). Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Holmann, F., Rivas, L., Argel, P. J. & Pérez, E. (2004). Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria*: Centroamérica y México. *CIAT, Documento de Trabajo No. 197*. Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2212/Adopcin%20de%20pastos%20Brachiaria%20en%20CA%20%20Mex-final.pdf?sequence=1>
- Lazcano, C. (1996). Oportunidades y retos en la utilización de leguminosas arbustivas como forraje suplementario en sistemas de doble propósito. En Tyrone, Clavero, Cepeda, Maracaibo & Ven (Eds). *Leguminosa forrajeras arbóreas en la producción tropical* (pp. 29-40). Zulia, Venezuela: Centro de transferencia de tecnología en pastos y forrajes de la Universidad de Zulia.
- Mendieta-Araica, B. (2011). *Moringa oleifera as an alternative fodder for dairy cows in Nicaragua*. (PhD thesis) Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 118p.
- Mora-Delgado, J. & Holguin. V. (2009). Familias, animales domesticos y sistemas de producción campesinos en America Latina (Capitulo 2). *En Concepto y Herramientas para la Intervención en Comunidades Ganaderas* (pp. 41-52). Tolima: Editorial Universidad Del Tolima.
- Muoghalu, J.I. (2010). Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. *Weed Research*, 48(2), 157-162.

- Olabode, O.S., Adesina, G.O., & Ajibola, A.T. (2010). Seasonal effects on the critical period for weed removal and okra performance on *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray infested field. *Annals of Biological Research*, 1(4), 67-72.
- Otusanya, O., & Ilori, O. (2012). Phytochemical screening and the phytotoxic effects of aqueous extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. *International Journal of Biology*, 4(3), 97-101.
- Rosales, M. (1999). Mezclas de forrajes: Uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. En Rosales, M., Murgueitio, E. & Osorio, H. *Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica* (pp. 201-231). Roma, FAO.
- Rúa, M. (2007). *Manual Ilustrado de Confinamiento Bovino*. Cultura Empresarial Ganadera. 187 p.
- Ruiz, T.E.; Torres, V.; Febles, G.; Díaz H. & González. J. (2012). Empleo de la modelación para estudiar el crecimiento del material vegetal 23 de *Tithonia diversifolia*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(1), 23-29.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: Environmental Issues and options*. Rome: FAO. Recuperado de <http://ftp.fao.org/docrep/fao/010/A0701E/A0701E00.pdf>. [Consultado: 13 / 05 / 2012].
- Wattiaux, M. (2000). Introduction to Silage-Making. *Dairy Updates*. University of Wisconsin: The Babcock Institute. Feeding No. 502, (p.12). Recuperado de <http://www.dairyweb.ca/Resources/Babcock/Silage.pdf> [Consultado: 05 / 02 / 2013].
- Zapata, A. & Silva, B.E. (2010). Reconversión ganadera y sistemas silvopastoriles en el departamento de Risaralda y el eje cafetero de Colombia. CARDER, CIPAV. Cali, Colombia. 112 p.

1.Revisión de Literatura

1.1 Descripción Botánica y Taxonómica

Botón de oro (*Tithonia diversifolia*) corresponde a la siguiente clasificación taxonómica y descripción botánica: División: *Spermatophyta*; Clase: *Dicotiledoneae*; Subclase: *Metaclamídeas*; Orden: *Campanuladas*; Familia: *Compositae*; Género: *Tithonia*; Especie: *diversifolia* (Hemsl.) Gray. Esta planta se adapta a diferentes condiciones agroecológicas y es bastante rústica sin presentar hasta el momento problemas fitosanitarios limitantes; tiene unas 15000 especies ampliamente distribuidas por todo el mundo y es posiblemente la que posee más ejemplares dentro de la flora apícola colombiana (Gómez & Rivera 1987).

El género *Tithonia* comprende 10 especies, todas originarias de México o Centro América, una de ellas, *T. diversifolia* (Hemsl.) Gray, fue introducida a las Indias Occidentales y a Ceilán. Esta especie fue descrita como planta herbácea de 1.5 a 4.0 m de altura, con ramas fuertes subtomentosas, a menudo glabras, hojas alternas, pecioladas, las hojas en su mayoría de 7.0 a 20.0 cm de largo y de 4.0 a 20.0 cm de ancho; con 3 a 5 lóbulos profundos cuneados hasta subtruncados en la base y la mayoría decurrentes en la base del pecíolo, bordes aserrados pedúnculos fuertes de 5 a 20 cm de largo; 12 a 14 flores amarillo brillantes o anaranjadas de 3.0 a 6.0 cm de longitud (Ríos & Salazar, 1995; Nash, 1976).

Por estas características constituye un recursos forrajero importante en el tropico para ser usado en sistemas sostenibles de producción animal. Se requiere hacer estudios en el manejo y tecnología de conservación de forrajes para optimizar este recurso con gran potencial en la alimentación animal.

T. diversifolia presenta alta capacidad de adaptación, lo mismo puede encontrarse al nivel del mar como a 2400m de altura aproximadamente y puede habitar en suelos de alta o baja fertilidad (Ruiz, Torres, Febles, Díaz & González, 2012). Es una planta perenne de

hoja ancha y ramificada (Otusanya & Llori, 2012), con arquitectura de hoja que forma dosel rápidamente lo que fácilmente aumenta la competencia por espacio con otras plantas (Olabode, Adesina & Ajibola, 2010). Se reproduce sexualmente y asexualmente, como se evidencia por la producción de semillas, la capacidad de los tallos para el rebrote abundante y la producción de nuevos brotes de yemas a partir de un corte (Muoghalu, 2010).

1.2 Distribución y Usos

T. diversifolia se originó en México, pero ahora está ampliamente distribuida en todas las zonas tropicales húmedas y sub húmedas de centro y sur América, Asia y África (Ojeniyi, Odedina & Agbede, 2012). Tiene un papel importante en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Adewole, Sridhar & Adeoye, 2010). De manera similar, se ha informado de que *T. diversifolia* puede mejorar los parámetros de crecimiento de algunas especies después del establecimiento de plántulas (Ademiluyi, 2012) y fortalecer el crecimiento de especies leñosas (Oke, Awowoyin, Oseni & Adediwura, 2011).

Es un inhibidor eficaz de la corrosión del acero de aleación de bajo contenido de carbono por su alto contenido de lignina (Alaneme & Olusegun, 2012). *T. diversifolia*, tiene efecto tóxico sobre insectos destructivos de tomate, chile, frijol, soya, yuca y melón, por su alto contenido de taninos (Bagnarello, Hilje, Bagnarello, Cartín & Calvo, 2009). Tiene alta producción de biomasa, debido a su capacidad para aprovechar los nutrientes del suelo (Mustonen, Oelbermann, & Kass, 2012)

En Chiapas, México, según la medicina popular local se considera útil en el tratamiento de las úlceras gástricas, posiblemente por la presencia de tagitinin C un agente relacionado con la protección de este tipo de enfermedades (Sánchez-Mendoza, Reyes-Ramírez, Cruz, Martínez Jiménez, Rodríguez-Silverio & Arrieta, 2011). *T. diversifolia* produce biomasa comestible de alta calidad alimentaria, tiene un alto potencial forrajero por lo cual se usa en los sistemas de corte para alimentación de ovinos, caprinos, bovinos (Alonso, Ruiz, Achang, Santos & Sampairo, 2012). Siendo asequible y localmente disponible, puede ser fuente alternativa de nutrientes y aumentar el rendimiento de otras especies como el maíz (Achieng, Ouma, Odhiambo & Muyekho, 2010).

1.3 Contenido Nutricional

Un estudio de Lezcano, Soca, Sánchez, Ojeda, Olivera, Fontes y Santana (2012) reporta datos de MS de la *T. diversifolia* que varían desde 13.5% hasta 25.0%, en función de la edad y la frecuencia de corte y los valores de proteína bruta variaron entre 11.00 y 29.79%, con diferencias significativas entre las hojas para los 30 y 60 días. Por su parte, Fasuyi y Ibitayo (2011) reportan que las hojas de *T. diversifolia* poseen un alto contenido de proteína bruta (20.6%).

En cuanto al contenido de fibra cruda los reportes oscilan entre 3.16 y 3.07 a los 30 y 60 días respectivamente para hojas, y 3.95 y 5.29 % (Hojas y tallos respectivamente) en época lluviosa, valores que se incrementan en la época seca (Lezcano et al., 2012), aunque hay reportes de 5.8% (Essiett & Uriah, 2013) y 21.8% en harina de hojas (Ekeocha & Fakolade, 2012). La fibra detergente neutra (FDN) reportada, varía desde 32.9% (Nieves et al 2011), 34% (Rosales, 1996) y 60% en harina de hojas (Ekeochaa & Fakolade, 2012). Además la planta contiene una amplia variedad de compuestos, entre sustancias solubles en agua y materiales menos solubles, diferentes cantidades de grasas, aceites, ceras, extractos tales como resinas, terpenos (Shokalu, Ojo, E-Adewoyin & Azeez, 2010), terpenoides en el aceite presente en las hojas (Mahecha & Rosales, 2005), saponinas y taninos en moderada cantidad presente en hojas frescas (Essiett & Uriah, 2013; Zhao, Xi, Chen, Li, Wang & Sun, 2012).

Por otra parte, la caracterización fitoquímica en periodo lluvioso y periodo poco lluvioso, reportó aminos primarios y secundarios, fenoles libres, taninos, triterpenos y/o esteroides y alcaloides, mientras que los glicósidos cardiotónicos, flavonoides, leucoantocianidinas y saponinas no se detectaron en ninguno de los períodos (Lezcano et al., 2012). La actividad biológica presentadas por *T. diversifolia* se pueden atribuir a la presencia de lactonas sesquiterpénicas, compuestos que se producen en grandes cantidades (> 2% en peso seco de hojas) y comprenden una clase importante de metabolitos secundarios responsables de varias actividades farmacológicas o tóxicas, aunque también incluyen algunos flavonoides y el ácido kaurenoico diterpeno (Chagas-Paula, Oliveira, da Silva, Gobbo-Neto, Gasparoto, Campanelli, Faccioli & da Costa, 2011).

1.3.1 Ensilaje de *T. Diversifolia*

El ensilaje de cultivos ha sido uno de los métodos más utilizados para mantener el contenido de nutrientes, lo que garantiza que sus propiedades, al abrir el ensilaje, sean lo más cercanas a las del material original. La calidad del ensilaje depende de las condiciones en las que se efectúa la fermentación, si es anaeróbica y a bajo pH, mejora la digestibilidad (Nkosing, Meeske, Langa & Thomas, 2011).

Por otra parte, el ensilaje constituye una estrategia de conservación de los nutrientes (González, 1994) basada en la fermentación anaeróbica gobernada por bacterias del género *Lactobacillus* (Wattiaux, 2000). Sin embargo, el conocimiento del proceso acidificante del medio y la ensilabilidad de *T. diversifolia* es limitado; esto obliga a evaluar el potencial acidificador de las cepas nativas de *Lactobacillus* (Holguín, Cuchillo & Martens, 2013) y la estabilidad del ensilaje bajo condiciones aerobias una vez abierto, para disminuir las pérdidas de nutrientes una vez que el ensilaje es expuesto a condiciones aerobias (Acevedo & Zeledón, 2009; Honig & Woolford, 1980). Al respecto, existen reportes que indican una optimización del proceso de fermentación anaeróbica inducido por mezclas que pueden mejorar las características del alimento (Bernal, 2007; Hess, Monsalve, Lascano, Carulla, Díaz & Kreuzer, 2003), especialmente con *T. diversifolia* (Fasuyi, Dairo & Ibitayo, 2010).

El estudio de Fasuyi et al., (2010), encontró que el nivel de 4% de melaza y 14 a 21 días de fermentación anaeróbica son los óptimos y apropiados en un ensilaje de hojas de *T. diversifolia*. Además, reporta que $\text{NH}_3\text{-N}$ y N soluble en agua se incrementaron con el paso del tiempo de fermentación; el aumento de la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$, en particular dentro de los 7 primeros días del ensilaje, coincidiendo con el informe de (McDonalds, Edwards, Greenhalgh & Morgan, 2002) quienes reportan la acción de microorganismos proteolíticos, principalmente *Clostridia*; mientras que el pH es aun relativamente alto como consecuencia de la descomposición de proteínas en aminoácidos, aminas y NH_3 .

Se resalta en el estudio de Fasuyi, et al., (2010) que los factores anti nutricionales detectados en hojas frescas de *T. diversifolia* (taninos, oxalatos, alcaloides y flavonoides) decrecieron gradualmente con el paso del tiempo de ensilaje.

1.3.2 Uso de Aditivos para Mejorar la Eficiencia de Ensilaje

Los aditivos en los ensilajes se usan para mejorar su calidad (Saricicek & Kilic, 2011). Los diferentes tipos de aditivos pueden mejorar la preservación del ensilaje, al beneficiar un predominio poblacional de bacterias lácticas durante el proceso de fermentación, aunque otros aditivos pueden ser fuente de energía como la melaza que representa una de las fuentes de carbohidratos usadas con más frecuencia en los ensilajes. Adicionalmente, el uso de la urea mejora también la calidad, al disminuir las poblaciones de levaduras y hongos, reduce las pérdidas de MS y carbohidratos no estructurales (Suárez, Mejía, González, García & Perdomo, 2011).

La inoculación de ensilaje con BAL como *Lactobacillus buchneri* se han utilizado ampliamente para mejorar la calidad (Li & Nishino, 2011). Estas bacterias inducen una mayor concentración de ácido acético y propiónico, lo cual indica que su capacidad en la conversión de ácido láctico a ácido acético puede ayudar a cambiar la ruta de la fermentación en ensilados de período prolongado; además, la inoculación con *L. buchneri* aumentó la estabilidad aeróbica y propiciar condiciones inhibitoras de la actividad de microorganismos indeseables, resultando en condiciones positivas en el valor nutricional de los ensilajes (Keles & Dmirci, 2011). Sin embargo, también la concentración de ácido láctico puede reducirse, posiblemente debido a la presencia de bacterias *L. buchneri* o *L. brevis* que pueden utilizar al ácido láctico como un sustrato (Ávila, Pinto, Figueredo & Schwant, 2009), para convertirlo en ácido acético. Por su parte, *L. buchneri* es eficaz para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje; estos inóculos ayudan a la fermentación del ensilaje hacia una ruta heteroláctica, buscando así reducir el número de levaduras, y por lo tanto aumentar el tiempo que el ensilaje se mantiene estable en la exposición aeróbica (Tabacco, Piano, Revello-Chion & Borreani, 2011).

1.4 Ensayos in Vitro

Los procedimientos *in vitro* son utilizados para investigar el efecto de los alimentos en la fermentación ruminal, para conocer el crecimiento de varios grupos microbianos y el grado de fermentación de estos (Hildebrand, Boguhn & Rodehutschord, 2011). El uso de este tipo de fermentador proporciona información útil antes de diseñar y realizar dietas, disminuye

el tiempo necesario en estudios *in vivo*, para confirmar los efectos de los aditivos en la alimentación del ganado (García-González, González & López, 2010).

Hay tres aproximaciones para medir la producción de gas: 1) medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, 2) medir la presión de gas a un volumen fijo, y 3) medir el número de incrementos de volumen requeridos para causar un pequeño cambio definido en la presión, (combinación de los métodos 1 y 2). La elección del método para medir la producción de gas depende del supuesto que los excesos de presión acumulada afectan el crecimiento microbiano (Schofield & Pell, 1995) y generan cambios en la solubilidad de los gases en el medio, lo cual puede generar errores en las mediciones (Getachew, Blümmel, Makkar & Becker, 1998).

Las técnicas de simulación de la fermentación ruminal (mediante cultivos continuos como el RUSITEC) y de producción de gas constituyen dos de los procedimientos experimentales *in vitro* más utilizados en la actualidad para el estudio de los procesos de fermentación ruminal, pues permiten el control de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación y de los factores de variación que la afectan (Rymer, Huntington, Williams & Givens, 2005).

La técnica de producción de gases constituye otro método *in vitro* útil para determinar la extensión y la cinética de degradación de sustratos, mediante el volumen de gas producido durante la fermentación (Theodorou & Williams, 1994).

Cuando en esta prueba *in vitro* se usa tampón de bicarbonato, se produce CO₂ en la neutralización de los ácidos grasos volátiles (AGV) generados (Pell & Schofield, 1993), resultando que alrededor del 50% del volumen total de gas producido tiene este origen, ampliándose a al 60% en dietas con alta proporción molar de propionato (Posada y Noguera, 2005; Getachew et al 1998). De esta manera, según Posada (2005), con base a los análisis de Opatpatanakit, Kellaway, Lean, Annison, & Kirby, 1994; Makkar (2000), el CO₂ producido desde el tampón puede encontrarse asumiendo que por cada mmol de AGV producido se libera 0.8-1.0 mmol de CO₂, dependiendo de la cantidad de tampón de fosfato.

Por otra parte, Schofield & Pell, (1995), indican que la técnica en mención mide la cantidad de gas liberado directamente de la fermentación e indirectamente como producto desde el fluido ruminal neutralizado.

Según Getachew et al (1998), el gas se genera principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato. Por otra vía, la actividad fermentativa hasta propionato produce gas solamente desde la neutralización del ácido, resultando en que una menor producción de gas corresponde con la fermentación propiónica.

El gas producido por gramo de materia seca (MS) o de materia orgánica (MO) desaparecida, puede ser estimada midiendo las pérdidas de sustrato a determinados intervalos de tiempo o al final de la fermentación (Williams, 2000).

Los métodos de simulación se basan en el mantenimiento de pequeñas cantidades de fluido ruminal bajo condiciones ambientales (anaerobias, de temperatura y cinética) controladas, de modo que la biota microbiana pueda actuar a discreción sobre la materia prima en prueba (Boudry, 2003; Menke & Steingass, 1988).

Entre los métodos de simulación usados por investigadores está el Artificial Rumen Simulation System - RUSITEC (Abel, Irmgard, da Costa Gómez & Steinberg, 2001), donde un equipo debidamente acondicionado permite el mantenimiento de una población normal del fluido ruminal, bajo condiciones estrictamente controladas durante largos períodos de tiempo (Martínez, Ranilla, Tejido, Ramos & Carro, 2010). Este sistema fue desarrollado por Czerkowsky & Breckeridge, (1977) y modificado por Machmuller, Soliva & Kreuzer, (2002) y se usa, específicamente, para determinar la fermentación, mediante la simulación de actividades fisiológicas de la digestión ruminal, permitiendo simular la fermentación ruminal durante periodos de tiempo relativamente largos.

1.5 Referencias

Abel, H.J., Irmgard, I., da Costa Gómez, C. & Steinberg, W. (2001). Effect of increasing dietary concentrate levels on microbial biotin metabolism in the artificial rumen simulation system (RUSITEC). *Archiv für Tierernaehrung*, 55(4), 371-376

- Acevedo Martínez, V.M. & Zeledón Hernández, E.N. (2009). *Estabilidad aeróbica del ensilaje de Marango con diferentes proporciones de Taiwá, Caña de Azúcar y Melaza*. (Trabajo de grado) Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Achieng, J.O., Ouma, G.G., Odhiambo, G.G., & Muyekho, F.F. (2010). Effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) and inorganic fertilizers on maize yield on Alfisols and Ultisols of western Kenya. *Agriculture & Biology Journal of North America*, 1(5), 740-747.
- Ademiluyi, B. (2012). Effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray on the Growth and Yield of Okra (*Abelmoschus esculentus*). *Journal of Agricultural Science & Technology B*, 2(2b), 219-222.
- Adewole, M. B., Sridhar, M. K. C., Adeoye, G. O. (2010). Removal of heavy metals from soil polluted with effluents from a paint industry using *Helianthus annuus* L. and *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) as influenced by fertilizer applications. *Bioremediation Journal* 14(4), 169-179.
- Alaneme, K., & Olusegun, S. (2012). Corrosion inhibition performance of lignin extract of sunflower (*Tithonia Diversifolia*) on medium carbon low alloy steel immersed in H₂SO₄ Solution. *Leonardo Journal of Sciences*, (20), 59-70
- Alonso, J., Ruiz, T., Achang, G., Santos L.D.T. & Sampaio, R.A. (2012). Producción de biomasa y conducta animal en pastoreo con *Tithonia diversifolia* a diferentes distancias de plantación. *Livestock Research for Rural Development*, 24(9). Recuperado de <http://www.lrrd.org/lrrd24/9/lazo24160.htm>
- Avila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueredo, H.C.P. & Schwant, R.F. (2009). Effects of an indigenous and a comercial *lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar care silage. *The Journal of the British Grassland Society. Grass and Forage Science*, 64, 384-399.
- Bagnarello, G., Hilje, L., Bagnarello, V., Cartín, V., & Calvo, M. (2009). Actividad fagodisuasiva de las plantas *Tithonia diversifolia* y *Montanoa hibiscifolia* (Asteraceae) sobre adultos del insecto plaga *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista De Biología Tropical*, 57(4), 1201-1215.
- Bernal, L. (2007). *Efecto de las mezclas de las leguminosas Calliandra calothyrsus, Flemingia macrophylla, Cratylia argentea y Vigna unguiculata ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal in vitro y producción de leche en bovinos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 122 p. Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/66186>
- Boudry, C. (Mayo, 2003). *Interest of in vitro predigestion to estimate fermentability of feedstuffs in pig large intestine*. Trabajo presentado en 9th International Symposium on digestive physiology in pigs Banff. Canada.
- Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., da Silva, V.C., Gobbo-Neto, L., Gasparoto, T.H., Campanelli, A.P., Faccioli, L.H. & da Costa, F.B. (2011). Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones, *Journal of Ethnopharmacology* 136 (2), 355–62.

- Czerkawski, J.W. & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- Ekeocha, A.H. & Fakolade, P.O. (2012). Effect of graded levels of Mexican sunflower leaf (*Tithonia diversifolia* Hemsl. A. Gray) meal on the feed intake of ewe during the entire gestation period of 150 days. *Scientific Journal of Animal Science*. 1(3) 107-118.
- Esiett, U. & Uriah, N. (2013). Comparative phytochemical and physicochemical properties of *aspilia africana* and *Tithonia diversifolia* leaves. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 3(3), 113-122.
- Fasuyi, A.O., Dairo, F.A.S. & Ibitayo, F.J. (2010). Ensiling wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaves with sugar cane molasses. *Livestock Research for Rural Development*, 22(42). Recuperado de <http://www.lrrd.org/lrrd22/3/fasu22042.htm>. [Consultado: 05 / 02 / 2013].
- Fasuyi, A.O., & Ibitayo, F.J. (2011). Nitrogen balance and morphometric traits of weanling pigs fed graded levels of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaf meal. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition & Development*, 11(3), 1-17.
- García-González, R.R., González, J.S., & López, S.S. (2010). Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum spp.*) and alder buckthorn (*Frangula alnus*). *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3755-3763. doi:10.3168/jds.2010-3107.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P. & Becker, K. (1998) *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72, 261-281.
- Gómez, A. y Rivera, H. (1987). *Descripción de malezas en plantaciones de café*. Centro Nacional de Investigación en café Chinchiná (Caldas). 490 p.
- González, B. (1994). Conservación de forrajes y consideraciones técnico-económicas. *Revista De Facultad De Agronomía*, 11(2), 190-206.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E. & Kreuzer, M. (2003). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, 703-713.
- Hildebrand, B., Boguhn, J. & Rodehutschord, M. (2011). Investigations on the effect of forage source, grinding, and urea supplementation on ruminal fermentation and microbial protein flow in a semi-continuous rumen simulation system. *Archives of Animal Nutrition*, 65(5), 402-414.
- Holguín, V.A., Cuchillo, M. & Martens, S. (2013). *Acidificación de forraje de Tithonia diversifolia para ensilaje mediante inoculación de cepas nativas y aditivos comerciales*. Memorias. ENICIP, Medellín.

- Honig, H., & Woolford, M. K. (1980). Changes in silage on exposure to air. In C. Thomas (Ed) *Forage Conservation in the 80s*. Trabajo presentado en XI British Grassland Society Occasional Symposium. Hurley, UK.
- Keles, G. & Demirci, U. (2011). The effect of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria on conservation characteristics of baled triticale–Hungarian vetch silage and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology*, 164(1-2), 21-28.
- Lezcano, Y., Soca, M., Sánchez, L.M., Ojeda, F.F., Olivera, Y., Fontes, D., & Santana, H.H. (2012). Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Spanish). *Pastos Y Forrajes*, 35(3), 283-292.
- Li, Y.Y., & Nishino, N.N. (2011). Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Letters in Applied Microbiology*, 52(4), 314-321. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.03000.x.
- Machmuller, A. Soliva, C.R. & Kreuzer, M. (2002). *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Canadian Journal of Animal Science*, 82, 233-239.
- Mahecha, L., & Rosales, M. (2005). Valor nutricional del follaje de Botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, 17(9).
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S.S., & Carro, M.D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3684-3698. doi:10.3168/jds.2009-2933
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. & Morgan C.A. (2002). *Animal Nutrition*. Sixth Ed. England: Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex.
- Makkar, H. P. S. (2000). Quantification of tannins in tree foliage: A laboratory manual. Vienna: FAO/IAEA.
- Menke, K.H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Reseah Development*, 28, 7-55.
- Muoghalu, J.I. (2010). Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. *Weed Research*, 48(2), 157-162.
- Mustonen, P. J., Oelbermann, M., & Kass, D. (2012). Using *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray in a Short Fallow System to Increase Soil Phosphorus Availability on a Costa Rican Andosol. *Journal of Agricultural Science*, 4(2), 91. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n2p91>

- Nash, D. & Williams, L. (1976). Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany* Vol 24, Part XII, p.323-325. Field Museum of Natural History, 1229. doi. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.2402>
- Nieves, D., Téran, O., Cruz, L., Mena, M., Gutiérrez, F., & Ly, J. (2011). Digestibilidad de nutrientes en follaje de árnica (*Tithonia diversifolia*) en Conejos de engorde. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 14, 309–304.
- Nkosi, B.D., Meeske, R.R., Langa, T.T., & Thomas, R.S. (2011). Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams. *South African Journal of Animal Science*, 41(4), 350-359.
- Ojeniyi, S.O., Odedina, S.A., & Agbede, T.M. (2012). Soil productivity improving attributes of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) and Siam weed (*Chromolaena odorata*). *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 24(3), 243-247.
- Oke, S., Awowoyin, A., Oseni, S. & Adediwura, E. (2011). Effects of aqueous shoot extract of tithonia diversifolia on the growth of seedlings of *Monodora tenuifolia* (Benth.), *Dialium guineense* (Willd.) and *Hildegardia barteri* (Mast.) Kosterm. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(2), 64-70.
- Olabode, O.S., Adesina, G.O. & Ajibola, A.T. (2010). Seasonal effects on the critical period for weed removal and okra performance on *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray infested field. *Annals of Biological Research*, 1(4), 67-72.
- Opatpatanakit, Y., Kellaway, R. C., Lean, I. J., Annison, G., & Kirby, A. (1994). Microbial fermentation of cereal grains in vitro. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45, 1247–1263.
- Otusanya, O. & Ilori, O. (2012). Phytochemical screening and the phytotoxic effects of aqueous extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. *International Journal of Biology*, 4(3), 97-101.
- Pell, A.N. & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*. 76, 1063-1073
- Posada S L y Noguera R R 2005: Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. #36. Retrieved November 8, 2016, from <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>
- Ríos, C.I. & Salazar, A. (1995). Botón de oro (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) una fuente proteica alternativa para el trópico. Primera parte. *Livestock Research for Rural Development*, 6(3). Recuperado de <http://www.lrrd.org/lrrd6/3/9.htm>. [Consultado: 13 / 11 / 2012].
- Rosales M. (1996). *In vitro* assessment of nutritive value of mixtures of leaves from tropical fodder trees. (Tesis Doctoral) D.Phil. Department of Plant Sciences, Oxford University, Oxford, UK.

- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H. & González, J. (2012). Empleo de la modelación para estudiar el crecimiento del material vegetal 23 de *Tithonia diversifolia*. *Revista Cubana De Ciencia Agrícola*, 46(1), 23-29.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A. & Givens, D.I. (2005). *In vitro* accumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed and Technology*, 123-124: 9-30.
- Sánchez-Mendoza, M., Reyes-Ramírez, A., Cruz, A.L., Martínez Jiménez, L., Rodríguez-Silverio, J., & Arrieta, J. (2011). Bioassay-Guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules*, 16(1), 665-674. doi: 10.3390/molecules16010665.
- Saricicek, B., & Kilic, U. (2011). Effect of different additives on the nutrient composition, *in vitro* gas production and silage quality of alfalfa silage. *Asian Journal of Animal & Veterinary Advances*, 6(6), 618-626. doi:10.3923/ajava.2011.618.626.
- Schofield, P. & Pell, A.N. (1995). Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *Journal of Animal Science*, 73, 3455-3463
- Shokalu, A.O., Ojo, A.O., E-Adewoyin, D.T., & Azeez, J.A. (2010). Evaluation of *Tithonia diversifolia* for soil improvement in celosia (*CELOSIA ARGENTEA*) Production. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 9(5), 951-957.
- Suárez, R.R., Mejía, J.J., González, M.M., García, D.E., & Perdomo, D.A. (2011). Evaluación de ensilajes mixtos de *Saccharum officinarum* y *Gliricidia sepium* con la utilización de aditivos. *Pastos y Forrajes*, 34(1), 1-10.
- Surber, L., Abdel-Haleem, H., Martin, J., Hensleigh, P., Cash, D., Bowman, J., & Blake, T. (2011). Mapping quantitative trait loci controlling variation in forage quality traits in barley. *Molecular Breeding*, 28(2), 189-200. doi:10.1007/s11032-010-9473-6.
- Tabacco, E.E., Piano, S.S., Revello-Chion, A.A., & Borreani, G.G. (2011). Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5589-5598.
- Theodorou, M.K. & Williams, B.A. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48, 185-197.
- Wattiaux, M. (2000). Introduction to Silage-Making. *Dairy Updates*. University of Wisconsin: The Babcock Institute,. Feeding No. 502, 12. Recuperado de <http://www.dairyweb.ca/Resources/Babcock/Silage.pdf> [Consultado: 05 / 02 / 2013].
- Williams, B. A. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En D. I. Givens, E. Owen, H. M. Omed, & R. F. . Axford (Eds.), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition* (p. 475). CAB International.

Zhao, G.-J., Xi, Z.-X., Chen, W.-S., Li, X., Wang, Y. & Sun, L.N. (2012). Two new cerebrosides from the aerial parts of *Tithonia diversifolia*. *Helvetica Chimica Acta*, 95(7), 1169-1174. doi:10.1002/hlca.201100522.

2. Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray en Candelaria, Valle del Cauca¹

Multi-criteria evaluation of 44 introductions of *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray in Candelaria, Valle del Cauca

V. A. Holguín³, S. Ortiz Grisalez¹, A. Velasco Navia² J. Mora-Delgado³

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. AA 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia / Universidad del Tolima. ² Programa de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. AA 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia. ³ Grupo de Investigación Sistemas Agroforestales Pecuarios, Universidad del Tolima. Barrio Santa Helena Parte Alta, A.A. 546, Ibagué (Colombia)

Email para correspondencia: vholguin@ut.edu.co

Resumen

La producción de forrajes, como fuente principal de alimentación de bovinos, ha generado proteína de alta calidad en carne y leche para satisfacer las necesidades humanas. La elección de forrajes no sólo debe basarse en las virtudes agronómicas, sino también en su valor nutricional, palatabilidad y nivel de toxicidad para el ganado. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta productiva forrajera de 44 introducciones de *T. diversifolia*, provenientes de varias localidades del centro occidente de Colombia, establecidas en una colección en el Centro Experimental Universidad Nacional sede Palmira (CEUNP)

¹ Este artículo fue publicado en la Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Bogotá. Vol 62 (2). 2015. Artículo recibido: 30 de noviembre de 2014 Aprobado: 15 de marzo de 2015

Candelaria (Colombia). Coordenadas 2°06' N y 65°03' O, con temperatura de 26°C y precipitación promedio anual de 1532 mm. Se evaluaron indicadores morfoagronómicos y nutricionales de las 44 introducciones; luego estas se clasificaron mediante estadística multivariada y la posterior aplicación de índices integrales (Índice de Potencial Forrajero Ponderado e Índice de Rendimiento y Calidad Ponderado).

Se seleccionaron las ocho introducciones más rendidoras y de mejor calidad nutricional; posteriormente solo cuatro fueron identificados como las más promisorias (códigos 17.9; 22,14; 13.5 y 1.2). Se concluye que el uso de índices integrales multicriterio facilita la selección de materiales rendidores, con base en diferentes criterios de adaptabilidad, productividad y calidad de las especies.

Palabras clave: Indicadores Multicriterio, Bromatología, Agronomía, Digestibilidad.

Abstract

Fodder production, the main source of cattle feed, has generated high quality protein in meat and milk to meet human needs. Choosing fodder should not only be based on agronomic properties, but also its nutritional value, palatability and toxicity for livestock. This study aimed to evaluate the forage production response of 44 introductions of *T. diversifolia*, from various localities in the west central Colombia, established in a collection at the National University Palmira (CEUNP) Experimental Center, Candelaria (Colombia). Coordinates 2°06' N and 65°03' W, with a temperature of 26°C and average annual precipitation 1532 mm. Morpho-agronomic and nutritional indicators of the 44 introductions were evaluated; these are then classified using multivariate statistics and the subsequent implementation of integral indices (Weighted Forage Potential Index and Weighted Index Performance and Quality). Eight introductions of higher yields and better nutritional quality were selected; then only four were identified as the most promising (17.9; 22.14; 13.5 and 1.2). We conclude that the use of multi-integral indices facilitates the selection of materials yielders, based on different criteria of adaptability, productivity and quality of species.

Keywords: Multicriteria indicators; Bromatology, Agronomy, Digestibility

2.1 Introducción

La producción de pastos y forrajes como fuente principal de alimentación de bovinos ha permitido generar proteína de origen animal a nivel de carne y leche para satisfacer las necesidades humanas (Bernal & Suárez, 2011). Sin embargo, uno de los principales problemas de los sistemas ganaderos en Colombia, es la producción estacional de forrajes con limitaciones en la satisfacción de las necesidades alimenticias de los bovinos, tanto en época de lluvia, como de sequía (Fujisaka, Holmann, Peters, Schmidt, Burgos, Mena, Posas, Cruz & Hincapié, 2005; Holmann, Rivas, Argel & Pérez, 2004).

La elección de pasturas y forrajes no sólo debe basarse en las virtudes agronómicas, sino también en su valor nutricional para el ganado (Ospina, Rosales & Ararat, 2002).

Los primeros criterios de selección de las especies forrajeras se basan en la capacidad adaptativa a condiciones agroecológicas específicas, la cual se expresa en indicadores productivos y morfoagronómicos como producción de biomasa, relación hoja: tallo, tasa de crecimiento y productividad por unidad de superficie.

Dentro de las especies forrajeras con potencial forrajero se encuentra *Tithonia diversifolia*, una planta arbustiva de vistosas flores amarillas, que presenta una amplia capacidad de adaptación, desde el nivel del mar hasta 2400 msnm aproximadamente. Además, puede habitar en suelos de alta o baja fertilidad (Ruiz, Torres, Febles, Díaz, Sarduy & González, 2012). Siendo asequible y localmente disponible, puede ser fuente alternativa de nutrientes y aumentar el rendimiento de otras especies como el maíz (Achieng, Ouma, Odhiambo & Muyekho, 2010).

Esta especie se ha difundido por diferentes espacios y condiciones climatológicas del mundo, sin embargo, se podría conjeturar que diferentes introducciones dispersas en espacios geográficos disímiles podrían tener comportamientos distintos cuando comparten un hábitat, tal como ha sucedido con otras especies leñosas (Ospina et al., 2002).

Por su parte, Sun et al., (2008) dieron cuenta de una posible variación celular ocurrida en algunas poblaciones que probablemente originadas de una sola línea de *T. diversifolia*,

pero que expresan diferentes respuestas adaptativas a diferentes condiciones ecológicas, lo cual a su vez, justifica la realización de una investigación que apunte a evaluar la respuesta productiva de diferentes introducciones en espacios agroclimáticos específicos para una planta de cubrimiento pancontinental, que se propaga por vía sexual y asexual, que coloniza ambientes y que por su interacción con ellos puede presentar variaciones productivas.

La fuente de variabilidad geográfica es un factor importante para las especies cultivadas que tienen un amplio rango de distribución, en la medida que además de su dispersión natural, estas han sufrido una amplia dispersión artificial por acción del hombre; así, al entrar en un nuevo nicho ecológico las plantas empiezan un nuevo proceso evolutivo en el cual crean estrategias de adaptación a variaciones del entorno (Hidalgo, 2003).

Estudios en otras especies leñosas con potencial forrajero dan cuenta de la variabilidad genética con base en caracteres morfológicos, de rendimiento forrajero, composición química, digestibilidad y fermentabilidad, como criterios para seleccionar las procedencias de mayor potencial para nutrición de diferentes especies animales (Ospina et al., 2002)

Para evaluar materiales de diferente procedencia una herramienta importante es la formulación de indicadores multicriterio de fácil construcción e interpretación por parte del productor (Garzón & Mora-Delgado, 2014). Cuando se emplean varios criterios en la construcción de indicadores se tiene más probabilidad de acierto en la caracterización y la toma de decisiones, de tal manera que los análisis multicriterio parten de la base de que el decidor debe establecer la importancia relativa de cada uno de los indicadores y de sus objetivos, para luego definir una estructura de preferencias que pueden expresarse mediante ponderaciones (Roche & Vejo, 2005).

Así, este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta productiva forrajera de 44 introducciones de *T. diversifolia*, provenientes de varias localidades del centro occidente de Colombia para identificar las de mejor crecimiento, calidad y productividad bajo un análisis multicriterio.

2.2 Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Centro experimental de la Universidad Nacional Palmira (CEUNP), localizado en Candelaria (Valle del Cauca), a 1.000 msnm; 02°06' N y 65°03' O. Pertenece a la zona climática cálido-moderada, según la clasificación de Holdridge, formación Bosque Seco Tropical (BS-T) (Rodríguez, 1999). Los suelos pertenecen al orden de los vertisoles (epiaquert ústico arcilloso fino isohipertérmico 1%) (Acosta, Aragón, Llanos & Madero, 1997)

2.2.1 Material Biológico

Se evaluaron características agronómicas de una muestra de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* de la colección del programa de Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. La misma fue establecida en octubre de 2012 con materiales provenientes de diferentes localidades del sur occidente de Colombia. (Tabla 2-1) mediante siembra de cangres de 60 cm de largo cada uno, a una densidad de 1 m de distancia entre sitios, 2 m entre surcos y cinco sitios por cada introducción (10 plantas).

Se hizo un corte de uniformización a los 4 meses, podando a 40 cm todas las plantas; en adelante se realizaron cortes cada 60 días. El área experimental tenía una superficie de 880 m², en los cuales se distribuyeron las 440 plantas.

Tabla 2-1. Procedencia de introducciones de *T. diversifolia* del sur occidente de Colombia

Código	Municipio	Departamento	Coordenadas Geográficas		Altura (msnm)
			Latitud N	Longitud O	
1.1	EL Cerrito	Valle	03 38 361	076 11 19.6	1448
1.2	EL Cerrito	Valle	03 41 09.6	076 11 29.5	1597
1.3	EL Cerrito	Valle	03 39 10.0	076 12 09.3	1313
1.4	Palmira	Valle	03 34 21.8	076 11 17.9	1555
1.5	Guacarí	Valle	DND	DND	1698
1.6	Guacarí	Valle	DND	DND	1698
1.7	El Cerrito	Valle	DND	DND	2100
1.8	El Cerrito	Valle	DND	DND	1313
1.9	La Unión	Valle	04 33 22	076 10 05	1593
10.2	Vía Versalles	Valle	04 33 54	076 11 11	1798
11.3	Anserma Nuevo	Valle	044 45 26	076 04 48	1217
12.4	Vía Anserma Nuevo vía la Argelia	Valle	04 47 44	075 59 56	1043
13.5	Vía Anserma Nuevo, la pedrera	Valle	04 48 57	075 59 07	982
14.6	Vía Anserma Nuevo la Argelia	Valle	04 50 38		1000
15.7	Vía Anserma Nuevo el Aguila	Valle	04 51 21	076 01 18	1235
16.8	Armenia	Quindío	04 33 53	075 39 38	1500
17.9	Filandia	Quindío	04 40 24	075 39 54	1900
18.10	Vía Filandia Quimbaya	Quindío	04 39 26	075 40 38	1824
19.11	Vía Quimbaya Alcalá	Valle	04 38 35	075 46 35	1359
20.12	Vía Quimbaya Alcalá	Valle	04 39 58	975 46 52	1324
21.13	Entrada a Alcalá	Valle	04 40 35	075 47 00	1309
22.14	Alcalá	Valle	04 40 26	075 46 42	1280
23.14	Alcalá	Valle	04 40 26	075 46 42	1280
24.1	Guacari	Valle	03 47 613	076 13 721	1698
25.2	Darien	Valle	03 53 193	05 76 26 895	1547
26.3	Darien	Valle	03 55 942	076 27 399	1483
27.4	Vía Buga, Loboguerrero	Valle	03 49 853	076 35 602	1481
28.5	Vía Loboguerrero, Cali	Valle	03 57 521	076 40 118	1191
29.6	Vía Bitaco, La Cumbre Pereira	Valle Risaralda	03 35 957 04 50 665	076 36 107 075 40 474	1543 1425
30.1	Vía Chinchina, Manizales	Caldas	05 01 592	075 35 278	1237
31.2	Fresno, Vía Padua	Tolima	05 08 802	075 06 657	2020
32.3	Mariquita	Tolima	05 09 279	075 02 946	1282
33.4	Vía Palo Cabildo	Tolima	05 06 667	075 02 627	1491
34.5	Casa Blanca	Tolima	05 05 329	075 05 561	1860
35.6	Vía Casabianca Líbano	Tolima	05 04 582	075 07 310	1953
36.7	El Líbano, vía Casabianca	Tolima	04 55 344	075 04 772	1678
37.8	Vía Líbano Ibagué	Tolima	04 57 436	074 59 212	1252
38.9	Vía Ibagué Cajamarca	Tolima	04 57 362	074 59 249	1249
39.10	Vía Popayan-Timbio	Cauca	02 20 52	076 41 553	1877
40.1	Vía Popayan- Timbio	Cauca	02 22 455	076 40 676	1800
41.2	Vía Popyan - Cali	Cauca	02 33 213	076 40 676	1735
42.3	Pescador	Cauca	02 50 335	076 32 539	1400
43.4	Vía Villarica el Puerto	Cauca	03 11 187	076 26 513	1026

Experimento 1: Prueba de rendimiento en campo

Se determinó:

Altura de dosel (HD) (cm). La cual se determinó semanalmente durante dos meses midiendo desde la estaca sembrada hasta la punta de la hoja bandera. Se promediaron los cinco sitios de cada introducción.

Ramas por sitio (RS) (N°). El conteo se realizó de forma manual.

Biomasa forrajera. La cosecha del forraje integral (tallos más laminas foliares) se realizó cada 60 días en estado de prefloración.

La biomasa total se determinó mediante corte manual con machete del dosel completo a 40 cm. Se determinó el peso en campo con una báscula digital portátil marca MC[®] de fabricación China.

Relación hoja/tallo (HT) (kg). Se determinó pesando por separado las hojas (PH) y los tallos (PT) para hacer el cálculo de la relación hoja/tallo medido en kilogramos.

Materia seca (MS) (%). Se tomaron muestras al azar por sitio de 250 g, siguiendo el protocolo de Nielsen (1998). Las muestras se trataron en una estufa de secado Binder[®] serie FD 53 a 105°C por 24 horas.

Productividad (P/ha) (kg/ha). Se calculó la productividad por superficie medida en cantidad (kg) de MS por hectárea.

Índice de Potencial Forrajero Ponderado (IPFP). Con base en las anteriores mediciones se calcula un IPFP aplicando el modelo de Ospina et al., (2002) (Ecuación 1) con base al estudio de Stewart & Dunsdon (1998) según el cual valores altos para cada característica que entra en ecuación son los deseables:

$$IPFP = \sum_{n=1}^{44} F_{(1)} \left(\frac{Xi_{(intr)} - X_{(1)}}{S_{(1)}} \right)$$

(Ecuación 1)

Donde:

$Xi_{(int)}$: promedio de la i . ésima característica para la introducción int. Con $i: 1, 2, \dots, k$ características

$X(i)$; promedio general de la característica i -ésima considerando todas las introducciones

$S(i)$: desviación estándar general de la característica i -ésima considerando todas las introducciones.

$F_{(1)}$: Factor de ponderación determinado con base al peso de las comunalidades constituidas con la matriz de correlaciones de las variables originales según el ACP siguiendo el procedimiento usado por Ordoñez (2014) y por Carmona (2014).

Experimento 2. Índice de Rendimiento y Calidad Estandarizado Ponderado (IRCEP).

Se calcula con base en medidas directas tomadas en campo de las cuales se derivó la selección de las 8 introducciones. Se tomaron mediciones de crecimiento y desarrollo de ramas cada 8 días. Esto se hizo en una muestra de cinco ramas en cada una de las introducciones, las cuales fueron marcadas con una cinta de color rojo para su identificación durante todo el periodo de monitoreo. A los 60 días se midió biomasa fresca en campo de área de dosel y área foliar, según el protocolo.

Para calcular el IRCEP se aplica el modelo de Ospina et al., (2002) (Ecuación 1) donde las variables involucradas en el IRCEP son:

Tasa de Crecimiento (TAC) (gr/día). Se calcula con base en la ecuación $TAC = (\text{peso } 1 - \text{Peso } 2) / (\text{tiempo } 1 - \text{ tiempo } 2)$, evaluando cinco muestras por cultivar.

Altura de Dosel (HD) (cm). Se calcula determinando la altura desde el suelo hasta la punta de la rama bandera.

Área Dosel (AD) (m). Se estima con base en la ecuación para el cálculo del área del círculo. Para ello, se toma la medida de dos diámetros perpendiculares del área de dosel y cada uno se divide entre 2 para luego desarrollar la ecuación $A = \pi (D1/2 * D2/2)$, donde D es el diámetro.

Área Foliar (AF) (cm). Se tomaron 10 hojas (cinco de la parte alta y cinco de la parte baja) al azar de cada introducción, las cuales fueron fotocopiadas y luego escaneadas. Las imágenes escaneadas fueron procesadas siguiendo el protocolo del software libre ImageJ® 1.47v, para obtener el área foliar de cada hoja; posteriormente, se promediaron los valores para cada introducción.

La biomasa en materia seca (BMS). Se estimó multiplicando el peso fresco por el porcentaje de MS determinado en una estufa a 105°C por 24 h, siguiendo el protocolo de Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

Calidad del forraje. Definida mediante al análisis químico para lo cual se determinó proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) siguiendo los protocolos de AOAC (1995).

El Valor Relativo Forrajero (VRF). Se calculó con base en el modelo para bovinos de Mertens (1987):

$$\text{VRF} = \text{Consumo} \times \text{Digestibilidad} / 1.29$$

Donde:

$$\text{Consumo} = 120 / (\text{FDN})$$

$$\text{Digestibilidad} = 88.9 - (0.779 \times \text{FDA})$$

Con base en los datos analizados en ésta prueba se escogieron las cinco introducciones con mayor IRCEP. En el índice se incluyeron tres tipos de variables: el primer tipo, correspondió a rasgos físicos de la planta (TAC, HD y AD); El segundo, fue caracterizado por la producción de forraje dado por AF y BMS y el tercer grupo, define la calidad del forraje dado por el porcentaje de MS, PC y el VRF de cada introducción.

2.2.2 Análisis Estadístico

Experimento 1.

Los datos de las variables analizadas fueron ordenados en una hoja de Microsoft Excel® para determinar medidas estadísticas de tendencia central (promedio) y dispersión - desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV)-, mediante un análisis univariado para determinar la variabilidad de los indicadores morfoagronómicos.

Con el objeto de agrupar las introducciones en función de diferentes criterios de evaluación de manera integrada, se hizo un análisis multivariado. Primero, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el objeto de identificar las variables de mayor peso en la diferenciación de las introducciones, cuyo resultado fue expresado en una gráfica biplot. Posteriormente, se hizo un agrupamiento de las 44 introducciones mediante un análisis de conglomerados (AC) con base en las variables antes explicadas para identificar el grupo con mejores características agronómicas.

Esta técnica busca conformar grupos que presenten la menor variabilidad posible dentro de sí mismos y los que presenten la mayor variabilidad entre otros grupos (Di Rienzo, Balzarini, Casanoves, Gonzalez, Tablada, & Robledo, 2008)

Para analizar la diferencia de medias de las diferentes variables entre conglomerados se hizo una prueba de T de Student. Los análisis multivariados y la prueba de diferencia de medias se realizaron en el programa estadístico Infostat® (Di Rienzo et al., 2008). Finalmente, del conglomerado con mejores características agronómicas se escogieron las introducciones más rendidoras con base en el IRPF.

Experimento 2.

En el experimento 2 la selección de las variables con mayor potencial forrajero se realizó mediante la aplicación del IRCEP.

2.3 Resultados y Discusión

Exceptuando los valores de la HD, los altos coeficientes de las variables (RS, TAC, PH, PT, H/T, MS y P/ha) indican mayor heterogeneidad de los valores, por lo cual se procedió a un análisis multivariado con base estas últimas siete variables (Tabla 2-2).

La alta variabilidad en TAC, PT, H/T Y P/ha sugiere una respuesta diferente de la especie a la variabilidad del espacio geográfico del cual fueron obtenidos los materiales; esta variabilidad se expresa en diferentes órdenes de suelos, condiciones climáticas y de manejo antrópico en los espacios de procedencia de las introducciones. Según Hidalgo (2003), se espera que a mayor rango de dispersión geográfica de una especie vegetal, ocurra una mayor variabilidad.

Tal variabilidad constituye un criterio básico en la tipología, ya que un coeficiente de variación (CV) alto en una variable determinada, sugiere una condición de heterogeneidad que se expresará en la tipificación. Por el contrario, un menor CV y una baja DE sugieren una baja variabilidad, por lo cual, posiblemente su influencia en el agrupamiento del análisis multivariado sea menor, como fue el caso de la MS.

Tabla 2-2. Medidas de tendencia central y dispersión del análisis univariado de introducciones (n = 44) de *T. diversifolia* evaluadas en Candelaria, Valle del Cauca

Parámetros	RS (N°)	HD (m)	TAC (gr/día)	PH (kg)	PT (kg)	H/T (kg)	MS (%)	P/ha (kg/ha)
Promedio	12.08	2.46	86.54	0.52	0.43	1.70	17.57	9191.13
Desviación estándar	4.81	0.40	52.16	0.20	0.28	1.19	4.40	5557.21
Coefficiente de variación	39.80	16.39	60.27	39.39	65.61	70.06	25.05	60.46

RS: Ramas por sitio, HD: Altura de dosel, TAC: Tasa de Crecimiento, PH: Peso de las hojas, PT: Peso del tallo, HT: Relación hoja tallo, MS: Materia seca, P/ha: Productividad por hectárea. *Copia personal del autor*

2.3.1 Análisis Multivariado

El conjunto de datos representado por siete variables y 44 introducciones fue sometido a un análisis de componentes principales (ACP), con el cual el número de variables fue

reducido, con una pérdida mínima de información. Los autovalores muestran que el primer componente con un valor $\lambda = 3$ explica el 43% de la variación, el segundo componente con un valor $\lambda = 1.48$ explica el 21% de la variación y el tercer componente con un valor $\lambda = 1.14$ explica el 16% de la variación. De acuerdo con lo explicado por Rojas (2003) se observa que la varianza asociada con cada componente principal es diferente y va decreciendo en orden. Estos tres primeros componentes explican el 80% acumulado de la variación del total de la muestra, lo que concuerda con López & Hidalgo (1994) quienes sugieren que se deben considerar como aceptables los componentes cuyos valores propios expliquen un 70% o más de la varianza total.

Esto permite la reducción de las variables a tres componentes (variables artificiales), donde el primer componente (productividad) se encuentra explicado principalmente por las variables TAC, P/ha y RS, con coeficientes de 0.53; 0.49 y 0.50, respectivamente. El segundo componente se explica por la variable H/T con un coeficiente de 0.70, variable que es inversa a PT, por lo cual esta última tiene un coeficiente negativo de -0.62. El tercer componente está representado por la variable MS con un coeficiente de 0.90.

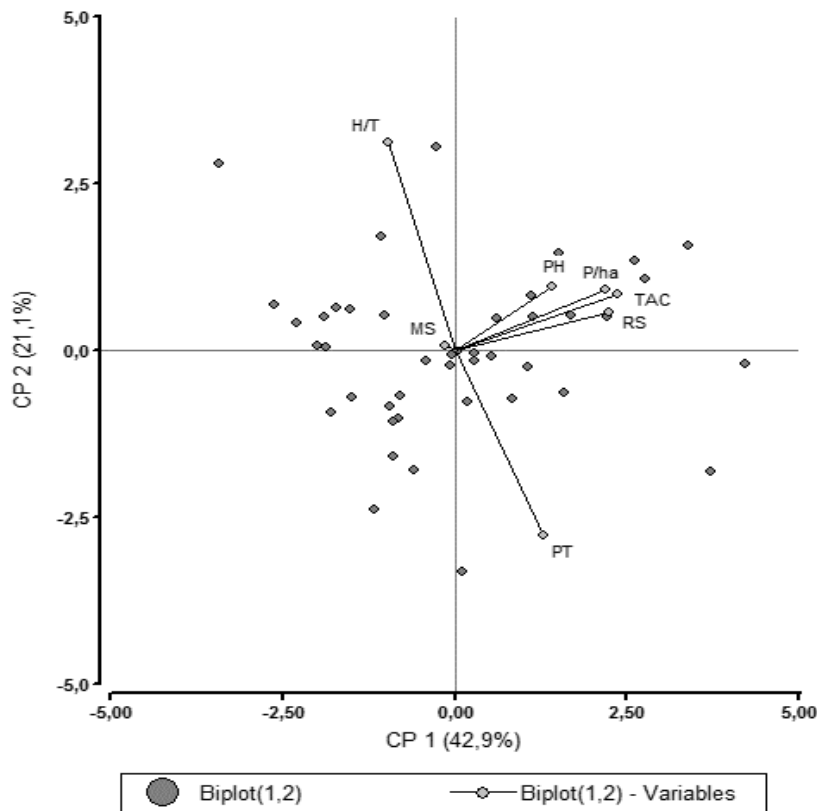
En la Figura 2-1 se observa que con estos dos ejes se explica el 64% de la variabilidad total en las observaciones. CP1 separa las introducciones entre las que tienen alta productividad influenciada por las variables RS, P/ha y TAC, en tanto que otro grupo de introducciones se relacionan por una alta relación H/T.

Al interpretar las asociaciones entre variables según los ángulos de los vectores que los representan, se puede inferir que las primeras variables con ángulos agudos indican correlaciones positivas, en tanto que H/T respecto a PT presenta un ángulo obtuso correspondiendo una correlación negativa entre las variables.

La MS es una variable que no constituye variación significativa en las diferentes introducciones como se indicó en el análisis univariado, esto concuerda con la FCA (2014) en el sentido de que si no se estandarizan los datos, las longitudes de los vectores son proporcionales a las varianzas de las variables, de tal manera que un vector de poca longitud sugiere poca variabilidad en la respectiva variable, como es el caso de la MS (Figura 2-2).

Siguiendo a Rojas (2003) se observa que la distancia al origen indica que las variables H/T y PT son las más importantes, siendo su contribución mayor mientras más distantes se encuentren.

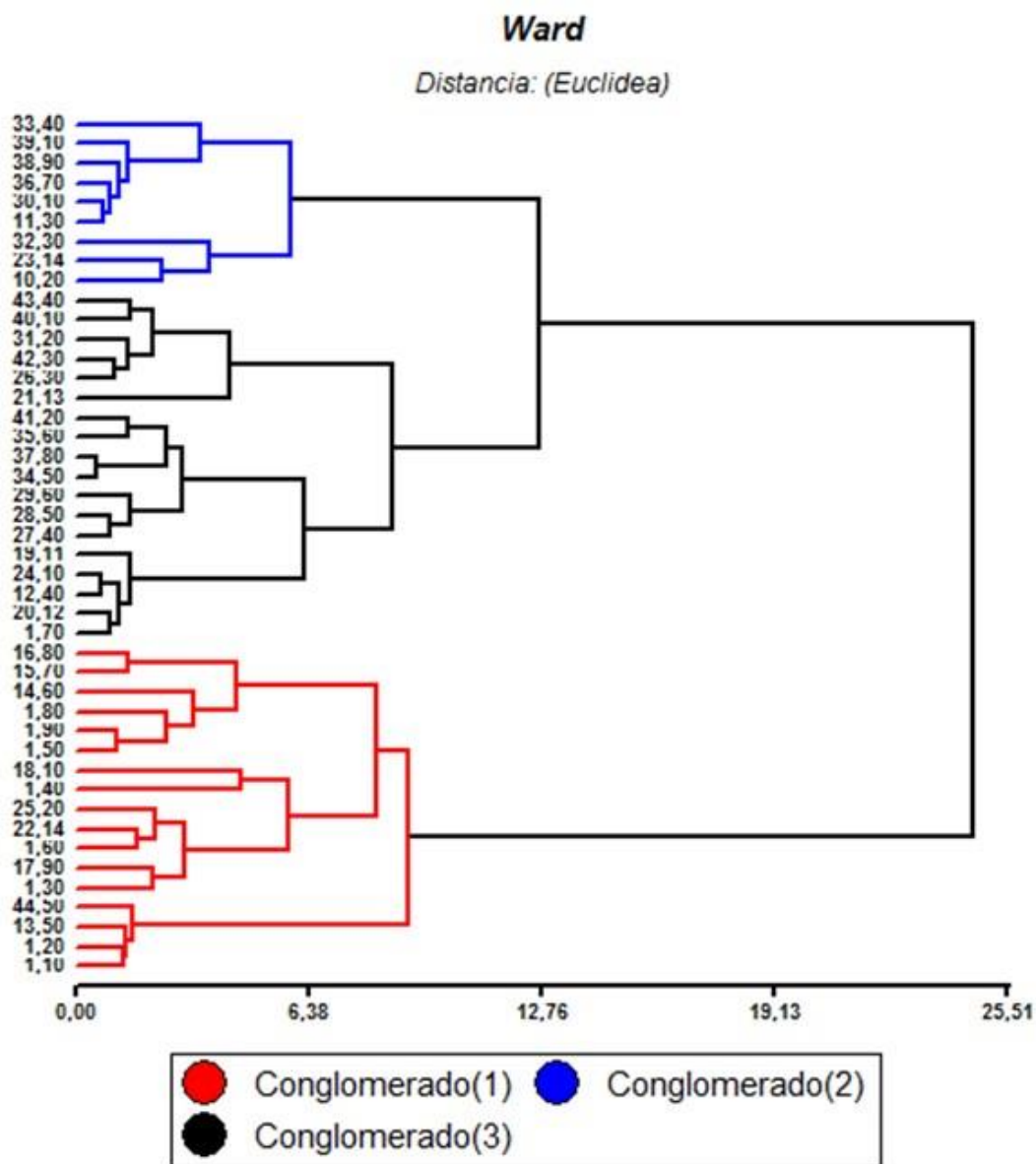
Figura 2-1. Análisis biplot para 44 introducciones de *T. diversifolia*



El peso de las diferentes variables hace que las introducciones se ubiquen en diferentes grupos, los cuales pueden apreciarse en el dendrograma resultante del análisis de conglomerados (AC) realizado con la técnica de Ward (1963) (Figura 2-2).

De acuerdo con Valerio, García, Acero, Castaldo, Perea, & Martos (2004) la tipificación tiene como propósito agrupar individuos de acuerdo con sus principales diferencias y relaciones, buscando maximizar la homogeneidad dentro de los grupos y la heterogeneidad entre ellos. Según Di Rienzo et al., (2008) esta técnica conforma conglomerados que presentan la menor variabilidad entre las introducciones del mismo grupo y la mayor entre las medias de los grupos.

Figura 2-2. Dendrograma de las 44 introducciones de *T. diversifolia* analizadas por análisis de conglomerados



Seguindo a Di Rienzo et al., (2008) fijando un criterio de corte arbitrario en la distancia 13 del eje X, las 17 introducciones del conglomerado 1 se separa del resto y por la procedencia se deduce que son materiales provenientes del valle geográfico del Cauca, principalmente de topografías planas.

Este conglomerado se separa del otro agrupamiento en el cual se diferencian los conglomerados 2 y 3, los cuales incluyen introducciones de topografías de ladera,

principalmente de los departamentos de Cauca y Tolima, aunque en ambos conglomerados también se cuenta con introducciones provenientes del valle geográfico del Cauca. Son los materiales del conglomerado 1, los que presentan mejores indicadores de productividad (RS, TAC y P/ha) con diferencias significativas frente a las introducciones de los otros conglomerados (Tabla 2-3).

De hecho, fueron las plantas que lograron mayor altura, aunque esta variable no se usó en el análisis multivariado por su bajo coeficiente de variación y por tanto solo se la reporta como información, pero no se tiene en cuenta en la discusión.

En el Conglomerado 2 se agruparon las introducciones que tienen una mejor relación H/T, aunque los valores numéricos de las otras variables son los más bajos, exceptuando PH. La MS fue una variable que no tuvo diferencias significativas entre los conglomerados, como se había previsto en el análisis univariado, aunque se encuentra dentro de los rangos reportados para esta especie en diferentes estudios, como lo reportado por (Lezcano, Soca, Sánchez, Ojeda, Olivera, Fontes, & Santana, 2012) con datos de MS de la *T. diversifolia* que varían desde 13.5% hasta 25.0%, en función de la edad y la frecuencia de corte.

Con el análisis de conglomerados se pudo separar el grupo de introducciones más rendidoras. Dentro de estas, se analizaron las comunalidades hasta los tres componentes seleccionados del ACP para definir los factores de ponderación de cada indicador que en este estudio integran el IPFP.

La comunalidad total estimada fue de 5.64, con base en la cual se estimaron los factores de ponderación: 0.14; 0.16; 0.08; 0.14; 0.15; 0.17 y 0.16, para RS, TAC, PH, PT, H/T, MS y P/ha, respectivamente.

Tabla 2-3. Características físicas y productivas de 44 introducciones de *T. diversifolia* clasificadas en tres conglomerados y evaluadas en el Valle del Cauca

	Conglomerados		
	1	2	3
	n =17	n =9	n =18
Ramas por sitio (n°)	15.44 ± 4.82 b	7.61 ± 2.19 a	11.14 ± 3.39 a
Tasa de crecimiento (gr/día)	132.16 ± 50.21 b	52.08 ± 34.24 a	60.68 ± 33.19 a
Peso de hoja (gr)	0.66 ± 0.25b	0.43 ± 0.10a	0.42 ± 0.08 ^a
Peso de tallo (gr)	0.53 ± 0.25b	0.14 ± 0.05a	0.48 ± 0.30b
Relación hoja/tallo (gr)	1.41 ± 0.57 a	3.41 ± 1.59b	1.13 ± 0.52 a
Materia seca (%)	18.90 ± 4.82 a	18.40 ± 3.53a	15.89 ± 4.02 a
Productividad (MS/ha)	14633.92 ± 4480.84b	5660.06 ± 3512.05a	5816 ± 2264.64 ^a
Altura (m)	2.62 ± 0.43b	2.14 ± 0.42a	2.48 ± 0.27ab

El alto coeficiente de ponderación para la MS es coherente con la respuesta productiva de las introducciones, en la medida que esta variable es el reflejo del comportamiento de materiales que poseen una alta capacidad de crecimiento clonal, en especial durante la época de lluvias, cuando las raíces adventicias y las yemas jóvenes emergen desde diferentes materiales de propagación, sexual o asexual, y se da la producción de nuevos brotes de yemas a partir de un corte (Muoghalu, 2010).

Estas características le dan capacidad de formar dosel, aumentando la competencia por espacio con otras plantas (Olabode, Adesina & Ajibola, 2010; Sun, Chen, Wang, 2008) y por ende un importante potencial de mayor producción de MS de alta calidad nutricional. El IPFP constituyó un indicador para escoger ocho introducciones promisorias por su respuesta productiva (Tabla 2-4).

Tabla 2-4. Introducciones seleccionadas del conglomerado 1 bajo aplicación de un índice de Potencial Forrajero Ponderado.

Código	RS	HD	TAC	PH	PT	H/T	MS	P/ha	IPFP
17.9	25	2.8	182.3	0.6	0.32	1.9	19.3	21770.6	1.09
1.4	17.5	2.4	217.7	0.26	1.24	0.2	16.2	21857.1	0.98
22.14	17	3.5	175.2	0.74	0.44	1.7	18.9	20533.6	0.88
1.8	17.5	2.7	140.3	1.16	0.52	2.2	17.4	15165.1	0.85
13.5	15	2.7	111.9	0.48	0.34	1.4	25.5	17665.5	0.61
1.3	20	2.4	119.0	0.54	0.38	1.4	20.4	15069.8	0.55
1.2	13.5	2.5	95.8	0.36	0.56	0.6	26.7	15864.6	0.48
1.6	15.5	2.8	190.3	0.52	0.42	1.2	14.6	17208.3	0.47

RS: Ramas por sitio, **HD:** Altura de dosel, **TAC:** Tasa de crecimiento, **PH:** Peso de las hojas, **PT:** Peso del tallo, **HT:** Relación hoja tallo, **MS:** Materia seca, **P/ha:** Productividad por hectárea, **IPFP:** Índice de potencial forrajero ponderado. *Copia personal del autor*

Estas ocho introducciones fueron sometidas a un segundo proceso de valoración bajo el criterio de indicadores de calidad y potencial forrajero.

Estos indicadores se integraron en un índice que permitió evaluar diferentes materiales con base a variables de rendimiento y calidad. De acuerdo con Ospina et al., (2002) el índice permite integrar variables para comparar las procedencias y seleccionar las más sobresalientes; su confiabilidad es buena en la medida de que el índice es el resultado del aporte de una característica que se expresa como la diferencia entre el promedio de dicha característica medida en la procedencia de interés y el promedio general de todas las procedencias, en unidades de DE general (Stewart & Dunsdon, 1998).

Experimento 2

Aunque las introducciones fueron clasificadas inicialmente en forma diferente por cada rasgo respecto a cuándo se analizaron juntos, los diferentes criterios ayudaron a clarificar las fortalezas relativas de las introducciones en función de las características físicas, productividad y calidad. Así, como se aprecia en la Tabla 5, las introducciones 22.14 y 17.9 sobresalen por características físicas y de productividad, aunque su desempeño en términos de calidad no fue deseable. En tanto que 1.3 y 1.8 son sobresalientes por atributos de calidad, especialmente por el VRF que es un índice sin unidades, que permite comparar la calidad de los forrajes de leguminosas, gramíneas y sus mezclas, bien sean en fresco, ensiladas o henificadas (Bastidas, Rea, de Sousa, Valle & Ventura, 2010). De hecho, los valores de (FDA) que es la que más incide en la digestibilidad, en estas introducciones son bajos (Tabla 2-5).

Sin embargo, con base en los resultados obtenidos para el VRF estas introducciones mejor calificadas apenas se clasifican en la categoría “de segunda” por encontrarse en el rango de 124-103 según la clasificación de la American Forage and Grassland Council (Calsamiglia, 1997).

Por el contrario, nótese que la introducción 1.4 tiene un alto porcentaje de proteína pero un VRF bajo, derivado del alto contenido de FDN y FDA (Tabla 2-5).

En este segundo experimento, se tomaron las comunalidades hasta los dos primeros componentes del ACP que explican el 69% de la variación y se definieron los factores de ponderación de cada indicador que en este estudio integran el ICERP. La comunalidad total estimada fue de 4.91, con base en la cual se estimaron los factores de ponderación: 0.20; 0.16; 0.02; 0.16; 0.11; 0.18 para TAC, AD, AF, BMS, MS, PC y VRF, respectivamente.

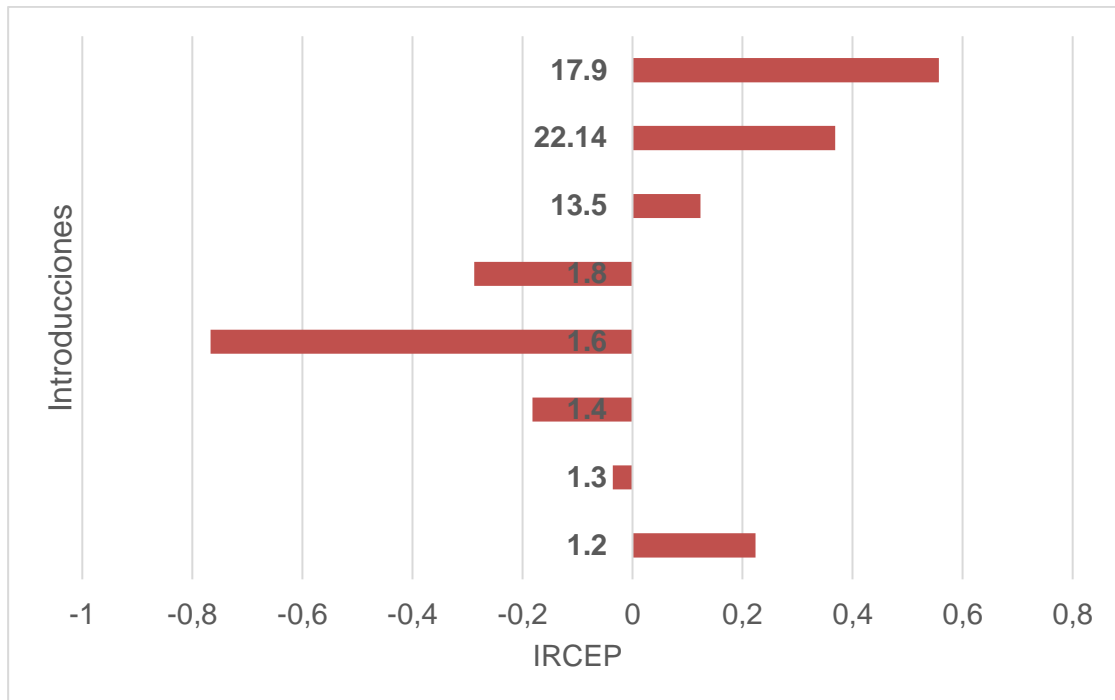
Tabla 2-5. Características físicas, productivas y de calidad de ocho introducciones de *T. diversifolia* evaluadas en el Valle del Cauca.

Introducción		TAC	Altura	AD	AF	BMS/planta	MS	FDN	FDA	PC	VRF
		(gr/d)	(cm)	(m)	(cm)	(kg)	(%)	(%)	(%)	(%)	
1.2	Media	90.3	217.7	3.7	68.4	2	24.9	52.8	48.53	12.9	90.1
	DE	20	32.3	1	14.9	0.6	0.9	1.49	0.03	0.46	2.51
1.3	Media	78.9	177	3.3	66.2	1.4	23.2	46.65	45.95	11.4	106
	DE	39.4	35.3	1	20.2	1.1	2.3	0.36	0.4	5.59	0.56
1.4	Media	58.5	180.8	3	66.4	1	24.8	60.68	53.04	23	73
	DE	50.2	47.8	1.8	8	1.3	0.4	1.52	1.48	9.17	0.92
1.6	Media	66.4	195.3	2.4	61	0.6	22.2	56.65	43.92	10.3	94.8
	DE	59.6	55.4	2.3	10.6	0.6	0.6	0.3	0.77	0.32	1.16
1.8	Media	68.3	193	1.4	75.2	1.4	23.3	47.67	45.85	12.5	104
	DE	21.3	19.3	1.3	13.4	0.4	1	1.68	1.73	0.31	6.29
13.5	Media	102.4	187.4	4.4	59.5	1.5	24.7	58.01	44.10	10.7	92.2
	DE	23.1	25.3	1.2	20.8	1.1	0.8	3.05	0.35	0.72	4.28
22.14	Media	166.5	232.4	5.1	69.4	2.1	21	56.20	50.45	11	83.2
	DE	17.1	47.7	0.5	20.8	1.9	2.5	0.93	0.07	0.92	1.22
17.9	Media	138.4	261.2	4.4	72.5	2	24.9	55,03	54,48	16.2	78.7
	DE	37.2	24.9	1.5	15.6	2	2.3	1.1	8.31	0.53	12.5

TAC: Tasa de crecimiento, **HD:** Altura de dosel, **(AD):** Área de dosel, **AF:** Área foliar, **BMS/planta:** Biomasa de materia seca/por planta, **MS:** Materia seca, **FDN:** Fibra detergente neutro, **FDA:** Fibra detergente ácido, **PC:** proteína cruda, **VRF:** Valor relativo forrajero. *Copia personal del autor*

Una vez hecha la evaluación integral mediante la fórmula de Ospina et al., (2002) por la combinación ponderada de factores se seleccionaron las introducciones 1.2, 17.9, 22.14 y 13.5 como las introducciones con mayor IRCEP (Figura 2-3), las cuales constituyen un material vegetal que puede cultivarse bajo las condiciones de suelos vertisoles logrando obtener los mejores rendimientos y calidad nutricional.

Figura 2-3. IRCP para ocho introducciones de *T. diversifolia* evaluadas en el Valle del Cauca



2.4 Conclusiones

Las introducciones de mayor producción forrajera fueron agrupadas en el conglomerado 1. Las cuales fueron diferentes del resto de introducciones. En este conglomerado, las procedencias son destacadas por productividad de forraje, presentando como características sobresalientes la elevada tasa de crecimiento, el número de ramas por sitio y la productividad por hectárea. Este grupo contrastó de manera relevante con las introducciones del Conglomerado 2 que se destacaron en la relación H/T y por un mayor peso de las hojas, variable que puede ser un indicador de calidad de forraje.

La caracterización cuantitativa permitió avanzar en el conocimiento de la variabilidad dentro de la especie, en cuanto a producción de forraje, y el análisis multivariado facilitó la discriminación entre introducciones, con base a rasgos que normalmente pasan desapercibidos y que se expresan de manera diferente en diversidad de ambientes.

La evaluación integral mediante el IRCEP permitió identificar las cuatro introducciones más promisorias en términos de productividad y calidad para ser manejadas en suelos vertisoles, previa realización de pruebas adicionales bajo diferentes condiciones climáticas.

Un índice compuesto como el IRCEP constituye una herramienta de utilidad en la toma de decisiones con criterios múltiples, pues cuando se clasifican las introducciones con base a indicadores de cantidad o calidad de manera independiente, los resultados son diferentes a los de un índice que integra múltiples criterios.

Cabe resaltar, sin embargo, que hay indicadores que pueden tener una mayor relevancia en el análisis de las variables; de hecho, las introducciones promisorias, determinadas por el IRCEP, son las que presentan menores contenidos de FDA y pared celular. A diferencia de la PC que es un indicador de calidad de un forraje, pero que no necesariamente coincide con un buen VRF bajo, en virtud de que este está condicionado a los contenidos de FDN y FDA

Agradecimientos

Al Centro Experimental de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira por facilitar el desarrollo de esta investigación. Al personal de apoyo de la misma y al señor Armando Zapata por el apoyo brindado durante el tiempo experimental. A la Universidad del Tolima por el financiamiento de los estudios doctorales del primer autor.

2.5 Referencias

- Acosta, J.R., Aragón, M., Llanos, Y. & Madero, E. (1997). Cartografía ultradetallada de suelos y evaluación de tierras del centro experimental de la Universidad Nacional de Colombia (CEUNP) sede Palmira. *Acta Agronómica* 47(1), 23-34.
- Achieng, J.O., Ouma, G.G., Odhiambo, G.G. & Muyekho, F.F. (2010). Effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) and inorganic fertilizers on maize yield on Alfisols and Ultisols of western Kenya. *Agriculture Biology Journal of North America*, 1(5), 740-747. doi: 10.5251/abjna.2010.1.5.740.747
- Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Washington D. C: AOAC International.

- Bastidas, L., Rea, R., de Sousa, O., Valle, A. & Ventura, J. (2010). Calidad forrajera de cinco variedades de caña de azúcar en Santa Cruz de Bucaral, Estado Falcón, Venezuela. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 2(2), 63-75.
- Bernal, L. & Suárez, R.A. (2011). La producción de forraje en el contexto del cambio climático. *Revista Ciencia Animal*, 4, 7-14.
- Calsamiglia, S. (Noviembre, 1997). Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. [Internet]. Trabajo presentado en XIII Curso de Especialización FEDNA, Barcelona, España. Recuperado de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/UsodeFibraenRumiantes.pdf [citado noviembre 15, 2014]
- Carmona, F. (2014). Un ejemplo de ACP paso a paso. Recuperado de <http://www.ub.edu/stat/docencia/Mates/ejemploACP.PDF> [citado noviembre 15, 2014]
- Di Rienzo, J.A., Balzarini, M.G., Casanoves, F., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2008). *InfoStat versión 2008*. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. (2014). Aplicaciones del análisis estadístico multivariado. Córdoba, Argentina: Aulas Virtuales, Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de <http://www.fca.proed.unc.edu.ar/mod/book/view.php?id=3458&chapterid=353> [Citado 11-11-2014].
- Fujisaka, S., Holmann, F., Peters, M., Schmidt, A., Burgos, C., Mena, M... Hincapié, B. (2005). Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua. *Pastos Tropicales*, 27(2), 3-92.
- Garzón, E.F. & Mora-Delgado, J. (2014). Análisis multicriterio del estado de las pasturas de la hacienda ganadera García Abajo en Corinto (Cauca, Colombia), *Revista de la Facultad De Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 61(1), 64-81. doi: [10.15446/rfmvz.v61n1.44182](https://doi.org/10.15446/rfmvz.v61n1.44182).
- Franco, H. & Hidalgo, R. (2003). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Boletín Técnico IPGRI*, 8, 2-27.
- Holmann, F., Rivas, L., Argel, P.J. & Pérez, E. (2004). Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria*: Centroamérica y México. CIAT, Documento de Trabajo No. 197. Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2212/Adopcin%20de%20pastos%20Brachiaria%20en%20CA%20%20Mex-final.pdf?sequence=1>
- Hidalgo, R. (2003). Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales (Boletín técnico No. 8). Cali.

- Lezcano, Y., Soca, M., Sánchez, L.M., Ojeda, F.F., Olivera, Y., Fontes, D. & Santana, H.H. (2012). Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*. 35(3), 283-292.
- López, J.A. & Hidalgo, M.D. (1994). Análisis de componentes principales y análisis factorial. En Ato, M. & López, J.J. (Eds.), *Fundamentos de estadística con Systat*. (pp. 457-503). Addison Wesley Iberoamericana/RAMA.
- Mertens, D.R. (1987). Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal Animal Science*, 64(5), 1548-1558.
- Muoghalu, J.I. (2010). Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. *Weed Research*. 48(2), 157-162. doi: 10.1111/j.1365-3180.2007.00613.x
- Nielsen, S.S. (Ed.). (1998). *Food Analysis*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Olabode, O.S., Adesina, G.O. & Ajibola, A.T. (2010). Seasonal effects on the critical period for weed removal and okra performance on *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray infested field. *Annales Biology Research*, 1(4), 67-72.
- Ordoñez, H. (2014). Estudio de la sustentabilidad de los sistemas de producción de café mediante indicadores en el municipio de La Unión, Nariño. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Ospina S, Rosales M, Ararat J.E. (2002). Variación genotípica en la composición química y digestibilidad de *Trichanthera gigantea*. *Agroforestería en las Américas*, 9(33-34), 24-32.
- Roche, H. & Vejo C. (2005). *Análisis multicriterio en la toma de decisiones*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República. Recuperado de <http://www.ccee.edu.uy/ensenian/catmetad/material/MdA-Scoring-AHP.pdf>. [Consultado 2014 febrero 15]
- Rodríguez, C.A. (1999). *Efecto de cuatro métodos de labranza sobre las propiedades físicas de un vertisol ústico y sobre la producción de Sorghum bicolor en el Valle del Cauca*. (Trabajo de grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Rojas, W. (2003). Caracterización morfológica de germoplasma estudios de casos: Caso 1. Análisis de la variabilidad genética en quinua. En Franco, T.L, Hidalgo, R. (Eds.). *Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos*. (pp. 27-40) Boletín técnico Nro. 8. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI)
- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H., Sarduy, L., González, J. (2012). Utilización de la modelación para estudiar el crecimiento de *Tithonia diversifolia* colecta 10. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(3), 243-247.

- Stewart, J.L. & Dunsdon, A.J. (1998). Preliminary evaluation of fodder quality in a range of *Leucaena* species. *Agroforestry Systems*, 40, 177-198.
- Sun, W. B, Chen, G., Wang, S.H. (2008). *Characteristics of Tithonia diversifolia: an alien invasive plant in Yunnan, south-west China*. (pp 1-7). Recuperado de <http://www.cabi.org/ISC/FullTextPDF/2009/20093081862.pdf>
- Valerio, D., García, A., Acero, R., Castaldo, A., Perea, J. & Martos, J. (2004). Metodología para la caracterización y tipificación de sistemas ganaderos *Documentos de Trabajo Producción Animal y Gestión*, 1. Recuperado de http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/14_19_10_sistemas2.pdf
- Ward, J.H, Jr. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236–244.

3. Estimation of leaf area of *Tithonia diversifolia* using allometric equations

Estimación del área foliar de *Tithonia diversifolia* utilizando ecuaciones alométricas

Vilma A. Holguín^{A, B, C}, Sanin Ortiz Grisales^A, Gisou Díaz^B y Jairo Mora-Delgado^B

^ANational University of Colombia, Palmira. A.A 237, Palmira – Colombia; ^BResearch Group of Livestock Agroforestry Systems, University of Tolima, A.A. 546, Ibagué – Colombia;

^CCorresponding author: Email: vholguin@ut.edu.co

Abstract

This study was developed in order to determine a mathematical function from linear measurements of length and width of *Tithonia diversifolia* (TD) leaves to estimate the leaf area of the plant nondestructively. Rapid, reliable and objective estimation of leaf area is essential for numerous studies in agronomy and plant physiology, however, it could be done usually by the availability of sophisticated and expensive electronic integrate methods. In this research, the most reliable equation that predicts the leaf area of TD, by non-destructively linear measurements of leaf geometry was calculated.

Allometric equations were developed by measuring leaf width (W), length (L) and leaf area (LA) of 92 leaves of TD, by a regression analysis. The actual leaf area was measured using *ImageJ* software. With the observed and estimated information a Pearson correlation analysis was realized. Pearson correlation coefficients oscillated between 0.93-0.94 for the best mathematical models. Equations which used as variable the product L*W presented strong relationships with the observed leaf area, manifested in high determination coefficients (R² = 0.89). Therefore, the use of the product of L*W as the dependents variable was found to be accurate to predict the TD leaf area. A lineal model was developed to predict the leaf area for the *T. diversifolia* ($\hat{y} = 0.755 + 0.438(W * L)$).

Keywords: Leaf blade; Phenology; Physiology plant; Forage

Resumen

Este estudio fue desarrollado con el fin de determinar una función matemática a partir de mediciones lineales de longitud y anchura de hojas de *Tithonia diversifolia* (TD), con el objeto de estimar el área foliar de forma no destructiva. La estimación rápida, fiable y objetiva de área foliar es esencial para numerosos estudios en agronomía y fisiología vegetal, sin embargo, esto se podría hacer por medio de métodos electrónicos integrados que son sofisticados y caros.

En esta investigación, se calculó la ecuación más fiable para predecir el área foliar de TD, por mediciones lineales no destructiva de la geometría de la hoja. Mediante un análisis de regresión, ecuaciones alométricas fueron desarrolladas con la medición del ancho (W) y la longitud (L) de la lámina foliar y su relación con el área foliar (AF) de 92 hojas de TD. El área foliar real fue medido con el software *ImageJ*. Con la información medida y la estimada se realizó un análisis de correlación de Pearson. Los coeficientes de correlación de Pearson oscilaron entre 0.93 a 0.94 para los mejores modelos matemáticos. Las ecuaciones que utilizan como variable el producto $L*W$, presentan fuertes relaciones con el AF . Esta fortaleza se manifiesta en altos coeficientes de determinación ($R^2 = 0.89$). Por lo tanto, se encontró que el uso del producto de $L*W$, como la variable dependiente, es robusta para predecir el área de la hoja de TD. Un modelo lineal fue desarrollado para predecir el área de la hoja para *T. diversifolia* ($y = 0.755 + 0.438 (W*L)$).

Palabras clave: Lamina foliar; Fenología; Fisiología vegetal; Forraje

3.1 Introduction

A scale population there is a statistical relationship between measures of an individual (Gould, 1966). The proportions between linear measurements of plants and measures of area or volume, obey a rule that is the same for all individuals living in the same conditions; this relationship is derived from the ontogenetic development of individuals, which is the same for all but the variability associated with the personal history of each. This is the basic

principle of alometría that predicts a measure of an attribute based on another measure (Picard, Saint-André & Henry, 2012).

Thus, an allometric equation is a formula that formalizes this relationship quantitatively. There is a more restrictive definition of alometría consisting of a relationship of proportionality between the relative increases of measures (Huxley, 1924; Gayon, 2000).

The leaf area (LA) is a variable of easy determination with which we can estimate the growth rate of a crop in a given period of time and photosynthetic capacity (Watson, 1937). Thus, measurements of LA are essential for research in plant physiology, agriculture and dendrology (Cabezas-Gutiérrez, Peña, Duarte, Colorado, & Silva, 2009; Broadhead, Muxworthy, Ong, Black, 2003) and generate empirical data useful for estimating biomass, how greater leaf area, the greater the amount of light that can capture, increasing primary production and therefore the production of dry matter. This feature is important in forage plants.

The study of plant growth require the measurement of two variables, evaluated at defined intervals such as leaf area (LA) and dry weight (DW) (Rojas & Seminario, 2014). With these two values derived by calculation, the growth rates of the individual plant or population (Gardner, Pearce & Mitchel, 1985) were estimated.

The plant leaf area is relate to the number of leaves and the size of these. Several methods are used to estimate leaf area (Lu, H.Y., Lu, C.T., Wei & Chan, 2004; Morgado, Horst, Rosado, Assunção & Dos Santos, 2013), some are very simple, ranging from visual estimates, to more sophisticated electronic integrators where leaf area used (Méndez, 1993). The most common is to estimate the leaf area by mathematical equations involving linear measurements such as length and width of the leaf and length of the petiole, or some combination of these variables, which have generally shown high precision (Blanco & Folegatti, 2005; Lopes, Brum, Santos, Faga, Luz & Madeiros, 2007). These methods are usually quick and not destructive; have shown a high accuracy (Campostrini & Yamanishi, 2001; Blanco & Folegatti, 2003).

In agronomic research, determining the leaf area provides reasoning for physiological studies involving plant growth, light interception, photosynthetic efficiency, and response to evapotranspiration and irrigation fertilizers (Blanco & Folegatti, 2005). It because the leaf is the main organ in the transpiration process, responsible for gas exchange between the plant and the environment, obtaining accurate measurements of leaf area is essential to the understanding of the interaction between crop growth and its environment (Morgado et al., 2013; Cintra de Jesús, Ribeiro do Vale, Resende Coelho & Costa, 2001).

Thereby, the use of linear measurements of leaves ensures, in a roundabout way, the determination of this variable as important in studies of plant growth without reaching destruction (Peksen, 2007). Determination of a measurement methodology for leaf area at low cost, efficient, fast and non-destructive, is essential for the expansion of research with different species.

But for this, we must first have a simple mathematical function (linear) which related in a simple way the calculation. The mathematical model can be obtained by correlation between the length of the leaf (L), width (W) or length by width (L*W) with the LA, through regression analysis. Nondestructive methods are based on linear measurements that are fast, easy to measure and provide good accuracy in growth studies of many plant species (Jerez & Diaz, 2014).

A quick and inexpensive method to estimate leaf area can be achieved by using a free program called ImageJ (Rincón, Olarte & Pérez, 2012). This is software for digital image processing programmed in Java and developed at the National Institutes of Health.

So that, the objective was to produce a reliable equation to estimate the leaf area of *Tithonia diversifolia* plants, non-destructively using linear measurements of the leaves as independent variables.

3.2 Materials and Methods

At first, they were selected at random and collected 93 leaves the bottom half of bushes *Tithonia diversifolia*. Origin of the material can be seen in the Chapter 2. Leaves were

harvested, at pre-flowering or early flowering stage in February 2013 in a TD field 60 days old, from different plant accessions, which were grown in the experimental farm at Universidad Nacional de Colombia, Palmira (24°C, 1.000 masl, annual precipitation 1020 mm and relative humidity 72%). It belongs to the climate zone warm-moderate, according to the classification Holdridge, Dry Forest Tropical (BS-T) (Rodríguez, 1999). The soils belong to the order vertisols (Fine clay ustic epiaquet isohyperthermic 1%) (Acosta, Aragón, Llanos & Madero, 1997)

These leaves were measured in two perpendicular axes; the measures were registered in a field format and subsequently transcribed into a spreadsheet Excel. The leaves were preserved between sheets of paper-Bon of 90 g and pressed to prevent spoilage. Subsequently, the leaf blades were scanned on a scanner (Loser Jet Pro1415fn).

To make the calibration of equipment, lines previously known length (2 cm), drawn on one end of the sheets of paper-Bon were measured. This mark is a measure of reference for further analysis, which the program was calibrated measures known.

To do this, on the computer screen, it was drawn with the mouse a reference line on the 2 cm mark previously drawn on paper.

Once generated image (actual area of the leaves), it is processed to measure the silhouette with *ImageJ* software applications (Version 1.45) (Rasband, 2007) Thus, the image area equivalent to the leaf area was obtained of each leaf. Having done this exercise, we proceed to manipulate the commands sequentially:

Analyze> Set Scale> Known distance: 2, Unit of length: cm, Global scale.

To process images, commands are used:

Process> Binary> Make binary.

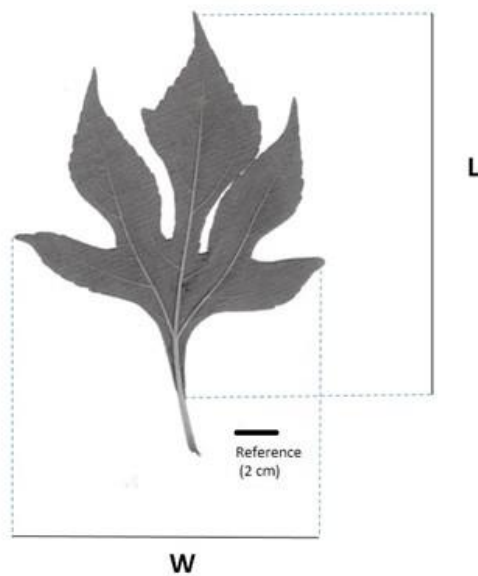
For the measurement of leaf area, this was delineated with the mouse, discarding pesiols with the "Wand" tool, and Analyze> Measure commands are used.

3.3 Statistical Analysis

Following Rincón et al., (2012) value measured leaf area (LA), as measured by *ImageJ* software, is the dependent variable. This was used to estimate the leaf area by operations between real measurements of length (L) and width (W) of the leaves, to generate Allometric equations. Correlation and regression tests were performed.

Leaf morphology varies among species and may be from oblong-oval to trilobadas. Thus, modifying the procedure Morgado et al., (2013) for species with more than one per lobe, were measured length of the midrib (L) and the largest width between the distal end of the outer lobes (W), as illustrated in Figure 3-1. These measurements were made up using ruler with accuracy of 0.1 cm.

Figura 3-1. Scheme representing how linear measurements were made length and width of leaves at *Tithonia diversifolia*



With these measures, the leaf area is estimated by simple linear correlation analysis. This estimate, following authors and previous research (Rojas & Seminario, 2014; Rincón et al., 2012; Jerez et al., 2014; Blanco & Folegatti, 2003); Morgado et al., 2013); Astegiano, Favaro & Bouzo, 2001; Casierra-Posada, Peña-Olmos & Tejedor, 2011; Cabezas-Gutiérrez, et al., 2009; Seminario, Urteaga & Medina, 2001; Bhatt & Chanda, 2003). It was

based on the following assumptions: The correlation between two variables, is given by the equation: $y = a + bx$. Where "y" is the dependent variable and "x" it is the independent variable. That is, in this case, the notation becomes: $LA = a + bx$. Where LA is the leaf area, "x" is any linear measurements, your product, or some combination; a and b are the parameters, intercept and slope, respectively. Thus, correlations between measurements L and W of the leaves (independent variables) and LA (dependent variable) to find a Pearson correlation coefficient (R) significant, suggesting the highest relationship between variables were calculated.

This analysis is valid assuming that the distribution of two continuous variables approaches the normal and were taken randomly from plants. Thus, the best correlation between two variables is one in which the "r" is close to +1 or -1. At the same time, by making a regression between the two variables, a mathematical model, whose slope indicates the degree of relationship between them is obtained. How higher the slope, the greater the relationship between variables. That is, the allometric equation steeper will be the best predictor of LA of each leaf. This is confirmed by a coefficient of determination (R^2) high.

3.4 Results

Linear measurements and its derivatives have important variation, this is understandable in the case of a collection of genetic material from different sources. The change is also reflected in the dispersion of the values expressed in the averages (\bar{x}), top and bottom of the parametric data, as presented in Table 3-1.

Table 3-1. Descriptive statistics of actual area and long dimensions, width and their combinations in *Tithonia diversifolia* leaves

Variables	\bar{x} (cm)	SD (cm)	Lower Limit (cm)	Upper Limit (cm)
AF	67.99	32.40	16.20	176.70
L*W	153.37	69.54	32.40	401.70
W	11.28	3.28	4.50	19.50
L	12.95	2.49	7.20	20.60
Ln (L/W)	0.17	0.17	-0.23	0.76
Ln (L-W)	0.41	0.76	-2.30	1.93
Ln (LA)	4.09	0.52	2.79	5.17

In Model 1, we worked with a level-level model. This equation can be interpreted as per centimeter increases in width, leaf area increased by about 4 units, if the length remains constant. Furthermore per centimeter to increase the length, leaf area increased by approximately 7 units provided that the width remains constant (Table 3-2).

In Model 2, the independent variable is the difference (L-W). He worked with a log-log model. With this model, we can interpret that when the difference between the length and width increases by 1%, leaf area is reduced by 0.31% (Table 3-2).

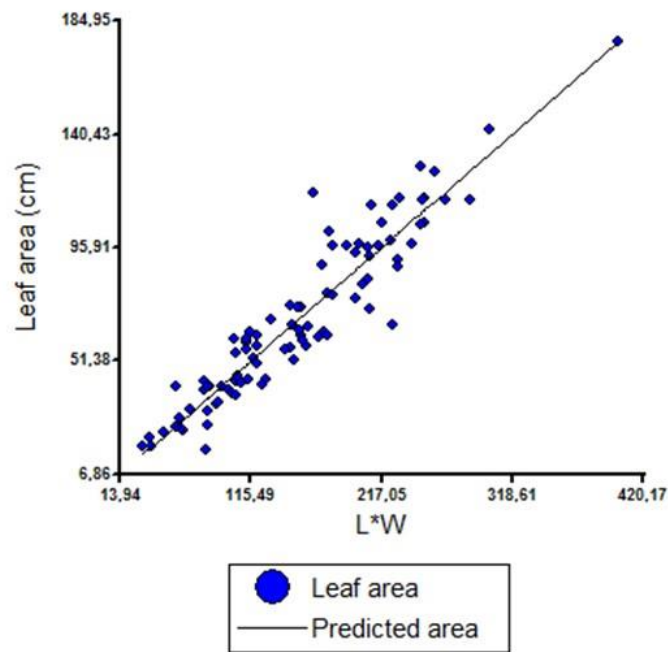
In Model 3 is the independent variable ratio (L/W). He worked with a log-log model. With this model, we can interpret that when the ratio between length and width increases by 1%, leaf area is reduced by 1.99% (Table 3-2).

In model 4 the independent variable is product (L*W). We worked with a level-level model. With this equation we can interpret it as the product of the length and width increases by 1%, leaf area is increased by 0.438% (Table 3-2).

The coefficient of determination suggest that models 1 and 4 were that best predict leaf area, however between these two statistics as MSE and BIC allow you to select one of the two.

Figure 3-2 shows the results of the test of the methodology performance for estimating LA, where we can see that estimated values of LA were very close to the measured values. The coefficient R^2 indicated that the estimations had a precision of 89%.

Figura 3-2. Estimated and measured leaf area (LA) for plants of *Tithonia diversifolia* (R2: 0.89)



In practical terms, the MSE is the sum of the variance and squared deviation estimator (Table 3-2). In the statistical modeling, the MSE is used to determine the extent to which the model does not fit the information, or if removing certain terms can simplify the model of charitable ways. The MSE provides a way to choose the best estimator: a minimum MSE often, but not always, indicates a minimum variation, and therefore indicates a good estimator. In turn, given two models estimated the model with the lowest value of BIC is the preferred.

The statistics suggest that model 4 is the allometric equation that best predicts the relationship between variables. Thus, the correlation between the product (L*W) and AF indicated that there is a high association between these variables ($R = 0.941$). The slope of the model and the coefficient of determination (R^2) of 0.885 suggests that the dependent variable is highly related to the product L*W. This means that the leaf area is explained by 88% by the product of the length by the width of the leaf blade. The remainder was due to other unknown factors. The Shapiro-Wilks test modified ($p = 0.933$) indicate that the sample conforms to the normal distributional assumption.

Tabla 3-2. Equations and statistical estimators derived from the analysis of correlation between the actual area and long dimensions, width and their combinations in *Tithonia diversifolia* leaves

Model	Variable	Equation	R	R ²	MSE	AIC	BIC
1	W,L	$\hat{y} = -69.77 + 4.07 * W + 7.09 * L$.932	.869	151.97	728.69	738.82
2	Ln (L-W)	$\widehat{\ln y} = 4.19 - 0.31 * \ln(L - W)$.453	.205	0.22	121.02	128.59
3	Ln (L/W)	$\widehat{\ln y} = 4.43 - 1.99 * \ln(L / W)$.657	.431	0.16	92.60	100.16
4	W*L	$\hat{y} = 0.755 + 0.438(W * L)$.941	.885	126.15	714.45	722.04

3.4.1 Discussion

From the above it follows that the best estimate of leaf area of *Tithonia diversifolia* is obtained by the product of $W * L$ (as independent variable in the Model 4). Although the shape of the leaves of this species is not regular so difficult to measure (Campostrini & Yamanishi, 2001), the relationship between measures of L, W and AF follows the same trend. This is a case of isometrics in where the variables grow at the same rate, maintaining a constant proportional size (absolute size but different) (Shingleton, 2010).

Previous studies have shown the adjustment measures throughout and its products as a predictor of leaf area in this type of irregular leaf blades. As the case of *T. diversifolia*, other species such as *Passiflora* sp., and *Ficus carica* L. leaves rough edges have been generated with high setting allometric equations (R^2 0.99). Although the observed data and calculated for this type of leaves have a greater dispersion (as shown limbo leaves lobed, which can lead to errors in determining the width of the leaf) for regularly shaped leaves (Casierra-Posada, Peña & Peña-Olmos, 2008)

Other authors also reported high correlation between leaf area and leaf geometry expressed in terms of length and width, in various crop plants (Rojas & Seminario, 2014) (*valeriana pilosa*); (Rincón et al., 2012; Jerez, et al., 2014) (*Solanum tuberosum*. L.); (Blanco & Folegatti, 2003) (*Cucumis sativus*); (Astegiano, et al., 2001) (*Lycopersicon*

esculentum Mill.); (Casierra-Posada, et al., 2011) (*Passiflora mollissima* and *Ficus carica* L.); (Lu, H.Y, et al., 2004) (*Colocasia esculenta*), (and Warnock, Valenzuela, Trujillo, Madriz, & Gutiérrez, 2006) (*Phaseolus vulgaris*).

Although the measurements require more time for determining the leaf area by taking data on length and width, these are the parameters commonly used, due to the high precision results and low error in predictions (Blanco & Folegatti, 2005).

3.5 Conclusions

In our study, very close relationships between the actual leaf area and the predicted leaf area by the model were found. A rapid and simple model was developed to predict the leaf area for the *T. diversifolia* ($\hat{y} = 0.755 + 0.438(W * L)$).

This model was chosen for their simplicity and capacity to produce results with the same level of accuracy as other more complex estimation models or expensive equipment. The equations relating the leaf area with the L, W and LxW for all crops are which demand less effort and time in the measurement at field because just two dimension could be measured. Dimensions of the leaves can be easily measured in the field.

Use of this equation would enable researchers to make non-destructive or repeated measurements of the same leaves. Thus, this non-destructive method to quickly obtain the leaf area of a crop and its use in both field work and laboratory.

Linear equations obtained for preflowering allowed to have a quick, reliable and easy estimation of leaf area. However, you may have required equations for other stages of the phenological cycle when the need for information requires greater precision. Moreover, it is suggested even within the same cultivar, try a best estimate of leaf area by separate leaves of different sizes. This then entails taking equations phenological stage and size of the leaves.

3.6 References

- Acosta J.R., Aragón M, Llanos Y, & Madero E. (1997) Cartografía ultradetallada de suelos y evaluación de tierras del centro experimental de la Universidad Nacional de Colombia (CEUNP) sede Palmira. *Acta Agrónomica*, 47(1), 23-34.
- Astegiano, E.D., Favaro, J.C. & Bouzo, C.A. (2001) Estimación del área foliar en distintos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) utilizando medidas foliares lineales. *Investigación Agraria. Producción y protección vegetales* 16(2), 249-256.
- Bhatt, M. & Chanda S.V. (2003) Prediction of leaf area in *Phaseolus vulgaris* by non-destructive method. *Bulgarian Journal Plant Physiology* 29(1-2), 96-100. Recuperado de http://www.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/v-29/03_1-2_96-100.pdf. [Consultado 20 de mayo de 2014].
- Bianco, S. Pitelli, R.A, & Pitelli, A.M.C.M. (2003) Estimativa da área foliar de *Typha latifolia* usando dimensões lineares do limbo foliar. *Planta Daninha*, 21(2), 257-261.
- Blanco, F.F. & Folegatti, M.V. (2003). A new method for estimating the leaf area index of cucumber and tomato plants. *Horticultura Brasileira*, *Brasília*, 21(4), 666-669.
- Blanco, F.F, & Folegatti, M.V. (2005) Estimation of leaf area for greenhouse cucumber by linear measurements under salinity and grafting. *Scientia Agricola*, 62(4), 305-309. doi.org/10.1590/S0103-90162005000400001.
- Broadhead, J.S., Muxworthy, A.R., Ong, CK, Black, C.R (2003). Comparación de los métodos para determinar el área foliar en filas de árboles. *Meteorología Agrícola y Forestal*, 115(3-4), 151-161.
- Cabezas-Gutiérrez, M., Peña, F., Duarte, H.W., Colorado, J.F. & Silva, L. (2009) Área foliar en especies forestales. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 12 (1), 121-130.
- Casierra-Posada, F., Peña, G.R. & Peña-Olmos, J.E. (2008). Estimación indirecta del área foliar en *Fragaria vesca* L., *Physalis peruviana* L., *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, *Rubus glaucus* L., *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey y *Ficus carica* L. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 11(1), 95-102.
- Casierra-Posada, F.; Peña-Olmos, J.E.; Tejedor, E. (2011). Banana passionfruit under saline stress. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 14(1), 31-38.
- Campostrini, E. & Yamanishi, O.K. (2001). Estimation of papaya leaf area using the central vein length. *Scientia Agricola*, 58, 39-40.
- Gayon, J. (2000) History of the concept of allometry. *American Zoologist*, 40(5), 748-758.
- Gardner, F.P., Pearce R.B. & Mitchel R.L. (1985) *Physiology of crop plants*. Iowa: State University Press. 327 p.

- Gould, S.J. (1966) Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews*, 41(4), 587-638.
- Huxley, J.S. (1924) Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature*, 114, 895-896.
- Jerez, E.M.R & Diaz, Y. (2014). Estimación de la superficie foliar en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) por métodos no destructivos. *Cultivos Tropicales*, 35(1), 57-61.
- Cintra de Jesús, W., Ribeiro do Vale, F.X., Resende Coelho, R. & Costa, L.C. (2001) Comparison of two methods for estimating leaf area index on common bean. *Agronomy Journal*, 93(5), 989-991. doi: 10.2134/agronj2001.935989x
- Lopes, S.J., Brum, B, Santos, V.J., Faga, E.B., Luz, G.L. & Medeiros, S.L.P.(2007) Estimativa da área foliar de meloeiro em estádios fenológicos por fotos digitais. *Ciência Rural*, 37, 1153-1156.
- Lu, H.Y., Lu, C.T., Wei, M.L. & Chan, L.F. (2004) Comparison of different models for nondestructive leaf area estimation in taro. *Agronomy Journal*, 96:448-453.
- Méndez F. (1993) Determinación del área foliar en plantas de caña de azúcar Variedad C 323-68 *Caña de Azúcar*, 11(2).
- Morgado, M.A., Horst, C., Rosado, L.D., Assunção, W. & Dos Santos, C.E. (2013) Estimación da área foliar por método não destrutivo, utilizando medidas lineares das folhas de espécies de Passiflora. *Revista Ceres*, Viçosa, 60(5), 662-667.
- Peksen, E. (2007). Non-destructive leaf area estimation model for faba bean (*Vicia faba*L.). *Scientia Horticulturae*, 113(4), 322-328.
- Picard, N., Saint-André, L. & Henry, M. (2012) Manual de construcción de ecuaciones alométricas para estimar el volumen y la biomasa de los árboles: del trabajo de campo a la predicción. Roma, Montpellier: FAO – CIRAD. 223 p.
- Rasband, W.S. (2007). *ImageJ*, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, recuperado de <http://rsbweb.nih.gov/ij/> [consultado: octubre, 2012].
- Rojas, J.M. & Seminario, J.F. (2014). Método alométrico para estimar el área foliar de “valeriana” (*Valeriana pilosa* Ruiz & Pav) al estado silvestre. *Arnaldoa*, 21 (2), 305-316.
- Rincón, N., Olarte, M.A. & Pérez, J.C. (2012). Determinación del área foliar en fotografías tomadas con una cámara web, un teléfono celular o una cámara semiprofesional. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 65(1), 6399-6405.

- Rodríguez, C.A. (1999) *Efecto de cuatro métodos de labranza sobre las propiedades físicas de un vertisol ústico y sobre la producción de Sorghum bicolor en el Valle del Cauca*. (Trabajo de grado). Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia
- Seminario, J., Urteaga, M., & Medina, S. (2001) Estimación del área foliar en seis morfotipos de “achira” comestible (*Canna edulis* Ker -Gawler) por método no destructivo. *Arnaldoa*, 8(2), 67-80.
- Shinglenton, A. (2010) *Allometry: The study of biological scaling*. *Nature Education Knowledge* 3(10), 2. Recuperado de <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/allometrythe-study-of-biological-scaling-13228439>. [Consultado 20 de octubre de 2011].
- Warnock, R., Valenzuela, J., Trujillo, A., Madriz, P., & Gutiérrez, M. (2006). Área foliar, componentes del área foliar y rendimiento de seis genotipos de caraota. *Agronomía Tropical*, 56(1), 21–42.
- Watson, D.J. (1937) The estimation of leaf area in field crops. *The Journal of Agricultural Science*, 27, (PP) 474-483. doi:10.1017/S002185960005173X.

4. *In-vitro* assessment for ensilability of *Tithonia diversifolia* alone or with *Pennisetum purpureum* using epiphytic lactic acid bacteria strains as inocula.

Vilma Holguín Castaño^{1,2}, Mario Cuchillo Hilario^{3,4,5}, Johanna Mazabel Parra³, and Siriwan Martens³

¹National University of Colombia, Palmira. Palmira, 0237, Colombia

²Research Group of Livestock-Agroforestry Systems, University of Tolima, Ibagué, 0546, Colombia

³Tropical Forages Program, International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali, 6713, Colombia

⁴Present Address: Animal Nutrition Department “Fernando Pérez-Gil Romo”, National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), Mexico City, 14000, Mexico.

⁵Corresponding author: email: mario.cuchilloh@incmnsz.mx

Abstract

Forage availability is predicted to have larger fluctuations in the coming years due to climate change. This study aims to improve ensiling of tropical forages as strategy to cope with food scarcity during long dry seasons on tropical latitudes. *Tithonia diversifolia* (TD), commonly called wild sunflower, is a non-leguminous dicotyledon rich in protein with a wide adaptation in tropical areas. For animal feeding, this forage could be an option all year round if it is conserved as silage. We evaluated the *in-vitro* ensilability of TD alone or with *Pennisetum purpureum* (PP). A preliminary Rostock Fermentation Test (RFT) was performed to compare the ensilability potential among four epiphytic lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from TD. Further, two experiments were designed 1) to evaluate the acidification potential of the best strain from the preliminary test (T735), and 2) to investigate the utilization of PP to facilitate the acidification and ensilability of TD. For the first experiment, T735 and a blend of lactic acid-fermenting bacteria (BLB) decreased the pH most rapidly. In experiment 2, we utilized various PP/TD ratios (0/100, 33/67, 67/33; and 100/0), inoculated with T735, (BLB) and their mixture. Increasing the proportion of grass in the mixtures brought about a fast drop in pH. The utilization of *T. diversifolia* as silage is

feasible. The use of epiphytic lactic bacteria (T735) improved acidification and fermentation parameters of TD and PP mixtures. Inclusion of *P. purpureum* facilitated TD ensilability and would be a valuable food source for animal maintenance and production during drought seasons under tropical environments.

Keywords: tropical forages, inoculum, LAB, wild sunflower

Resumen

Se prevé que la disponibilidad de forraje para animales tendrá mayores fluctuaciones en los próximos años debido al cambio climático. Este estudio tiene como objetivo mejorar el ensilado de forrajes tropicales como estrategia para hacer frente a la escasez de alimentos durante las estaciones secas prolongadas en las latitudes tropicales. *Tithonia diversifolia* (TD), comúnmente llamado botón de oro, es una dicotiledónea no leguminosa rica en proteínas con una amplia adaptación en las zonas tropicales. Para la alimentación animal, este forraje podría ser una opción durante todo el año si se conserva en forma de ensilaje. Se evaluó la aptitud para el ensilaje *in-vitro* de TD solo o con *Pennisetum purpureum* (PP). Una prueba preliminar de fermentación Rostock (RFT) se realizó para comparar la potencial aptitud para ensilaje de cuatro cepas aisladas de TD de bacterias epifitas de ácido láctico (BAL). Así, se diseñaron dos experimentos: 1) evaluar el potencial de acidificación de la mejor cepa identificada en una prueba preliminar (T735), y 2) investigar la utilización de PP para facilitar la acidificación y la ensilabilidad la DT. Para el primer experimento, T735 y una mezcla de BAL de fermentación (BLB) disminuyeron el pH más rápidamente que el control. En el experimento 2, se utilizó diversas proporciones de (PP/TD) (0/100, 33/67, 67/33 y 100/0), inoculados con (T735), (BLB) y sus mezclas. El aumento de la proporción de gramínea en las mezclas provocó una caída rápida en el pH. La utilización de *T. diversifolia* como ensilaje es factible. El uso de bacterias acidolácticas epifitas (T735) mejoró los parámetros de acidificación y de fermentación de las mezclas de TD y PP. La inclusión de *P. purpureum* facilitó aptitud para el ensilaje de TD y sería una valiosa fuente de alimento para el mantenimiento y la producción animal durante las temporadas de sequía en ambientes tropicales.

Palabras clave: Forrajes topicales, inoculos, BAL, Botón de oro

4.1 Introduction

Conservation strategies of forage such as ensiling, are topics of interest for animal scientists in tropical countries who aim to cope with seasonal forage scarcity. In particular, there is a demand to ensure food availability throughout the year and fill the gaps in times of food shortage for animal maintenance and production (Ibrahim, Franco, Pezo, Camero, & Araya, 2001; Martens, Hoedtke, Avila, Heinritz, & Zeyner, 2013). Local forages are the feed base for herbivore production in tropical America. Forages can contribute to a sustainable food system, if their nutritional value is properly preserved. Furthermore, local vegetation resources help to diminish the use of external inputs and create a more resilient agriculture. *Tithonia diversifolia* (TD) is a bush originated from Mexico and widely distributed throughout the humid and sub-humid tropics of Central and South America, Asia and Africa (Sonka, 1997; Jama, Palm, Buresh, Niang, Gachengo, Nziguheba & Amadalo, 2000). Ensilability of leguminous and non-leguminous forbs can be limited by the high buffering capacity (Otthuis, Luo & Bergveld, 1994), organic acids (Lukač, Kramberger, Meglič, & Verbič, 2012), low water soluble carbohydrates (WSC) concentrations and high content of secondary compounds (Wyss & Vogel, 1999). Thus, the ratio of WSC to buffering capacity (BC) for TD, is presumably low for proper ensiling.

However, it has been documented that ensiling commonly reduces antinutritional compounds such as tannins, oxalic acid and trypsin inhibitory activity (Lukač et al., 2012b; Martens, Tiemamm, Bindelle & Peters, 2012). Titterton & Bareeba (2001) have shown that blending grasses and legumes can improve ensilability (pH between 3.7 - 4.5; NH₃-N <12% of total N). TD is a non-legume forage with a high protein value (20% in DM) on average (La O et al., 2012). Therefore, it is necessary to develop strategies to compensate for TD's buffering capacity (Nhan, Hon & Preston, 2011) and for low WSC when ensiling. The Rostock Fermentation Test (RFT) is a rapid *in-vitro* test in aqueous solution that allows a quick evaluation of the ensilability of forages. The pH is used as indicator for the degree of lactic acid fermentation that has taken place (Zierenberg, Friedel, Glatzle & Chudy, 2001).

The objective of this study was to evaluate the fermentative ability of LAB's strains isolated from *Tithonia diversifolia* (TD) compared to other local and commercial additives to favor acidification of TD forage for ensiling. Likewise, this study investigates whether the inclusion of *Pennisetum purpureum* (PP) can improve the ensilability of TD.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Forages and Experimental Design

TD forage was harvested (10 cm above-ground biomass including leaves and stems) at pre-flowering stage in February 2013 on the experimental farm from the National University of Colombia, Palmira (1.000 masl, 24°C, annual precipitation 1020 mm and relative humidity 72%). PP was harvested at vegetative state (10 cm above ground level) at the same time and location. The Rostock Fermentation Test (RFT) developed by Pieper et al., (1989); Zierenberg (2000), was used to quickly evaluate in-vitro ensilability, with pH measured at 0, 20, 28, 44 and 48 h along the incubation period (37°C).

Bacterial strains determination was performed at the Clinical Laboratory of Tolima University as follow: an aliquot of 50 g of TD forage was taken, to which 450 ml of buffered peptone water (1/10) were added. Then, serial dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ... 10^{-7}) were performed. Dilutions were cultivated in MRS agar by the pour plate method. Epiphytic lactic acid bacteria (LAB) from TD were cultivated on MRS agar (Petri dishes) and incubated at 37°C for 72 hours under anaerobic conditions.

Colonies were counted and single colonies were isolated for their further use as inoculum. The criteria to select the LAB's strains were in base of their ability to growth on Rogosa agar and their ability to produce lactic acid (3M Petrifilm AC) according to Nero, Beloti, Barros, Ortolani, Tamanini & Franco (2006). Further, the API 50 CH test kit and the API CHL medium (bioMérieux Vitek Inc.) were used to determine the strains of each LAB isolate by characterizing the ability to ferment 49 carbohydrates. The culture dilutions were then loaded to the API 50 CH test strips following the manufacturer's protocol. Species identification was read in the software API web (BioMérieux, Inc. 2009). To label the four isolated strains a "T" (coming from *Tithonia*) was used followed by a consecutive number, according to the intern serial number of the International Center for Tropical Agriculture's (CIAT) LAB collection: T732, T733, T734 and T735.

A preliminary assay (RFT) was performed to compare ensilability among the four epiphytic bacteria strains isolated from TD to acidify TD forage. They were tested against a blend of lactic acid-fermenting bacteria (BLB) based on *Streptococcus faecium* (CNCM I-3236), *L.*

plantarum (CNCM I-3235), *Pediococcus acidilactici* (CNCM I-3237) and *L. salivarius* (CNCM I-3238) and a control of TD with sucrose (TD+S) in triplicate. The registration numbers belong to the National Collection of Microorganisms Cultures - CNCM (<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Cncm/>).

In the first experiment, five treatments in three replicates were tested on TD forage. The best epiphytic strain, isolated from TD (T735) was tested against two LAB from the CIAT's bacteria collection (C726=*L. plantarum*, C727= *L. pentosus*, both isolated from *Flemingia macrophyla*, a blend of lactic acid-fermenting bacteria (BLB) and a control (TD+S). A sample of 50g of forage was minced in a food processor (Power Pro II FP1510) and introduced into an autoclaved beaker (500 ml) containing 200 ml of a solution with sucrose (0.5% w/v).

All treatments were enriched with sucrose (S) as the energy source. Sucrose was used to ensure that the availability of WSC for microbial activity would not be limiting. A sterilized stirring rod was used to homogenize the preparation. Later, each inoculant was applied to the medium in three replicates (0.1 ml of an inoculum 4×10^9 cfu/ml previously cultivated in 10 ml MRS broth at 37°C for 24 h). The preparations were covered with a sterile plastic lid and incubated at 37°C for 48 h. The pH was measured using a pH meter (Mettler Toledo, Seven Go, with pH electrode In Lab@ 41356/2mat) at 0, 20, 28, 44 and 48 h, disinfecting the electrode with 70% ethanol between each measurement. The fermentation coefficient (FC) was estimated following the formula of Weissbach et al., (1974): $FC = DM (g/100 g) + 8 WSC/BC$.

In experiment 2, the effects of including the grass (PP) with TD on the ensilability was evaluated, using the inoculants T735, (BLB) and their combination (T735+BLB) plus a control. All treatments (in triplicate) on the (RFT) essay were enriched with sucrose at 2 % of fresh matter.

4.2.2 Chemical Analysis

The nutritive value analyzes were performed according to the AOAC 930.15, NFTA Method 2.1.4 standards. For determination of dry matter, we used the AOAC 973.18, NFTA Method 4.1. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2010). For that, 1 g of the fodder

of freeze-dried material was weighed and dried for 3 h at 105°C in a cabinet dryer. The dried sample was collected in a desiccator and weighed again after cooling down. The sample for dry matter was then incinerated for 5 h at 600°C in a muffle furnace to determine the crude ash. For *in vitro* digestibility of dry matter and crude protein (CP) was determined by the AOAC 984.13.

The method of Tilley & Terry (1963) modified by Moore (1970) was used for the analysis of the cell wall components, as neutral detergent fiber (NDF) and for Acid Detergent Fiber (FDA), Van Soest & Robertson (1985) was used. The determination of total water soluble carbohydrates was done by anthrone method, following the protocol of Herrera Flores, Ortiz Cereceres, Delgado Alvarado & Acosta Galleros (2014). Buffering capacity (BC) was determined using the method of Weissbach (1967).

4.2.3 Statistical Analyses

In experiment 1, the general effect of inoculant treatments was assessed using the model $Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i$ (where Y_i is the target variable, μ is the overall mean, α = inoculant, ε = random experimental error). Analysis of variance was performed by the GLM procedure in SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

In experiment 2, we used a split-plot design with factorial treatment structure, where the first factor was the inoculant used and the second factor was the inclusion level of PP in the mixtures: $Y_{ij} = \mu + I_i + PP_j + I_i \times PP_j + \varepsilon_{ij}$; where Y_i is the target variable, μ is the overall mean, I = inoculant [control, T735; a blend of lactic acid-fermenting bacteria (BLB); T735 x (BLB)], PP = proportion of grass in the silage [(0:100, 33:67, 67:33; and 100:0 (FM weight)] and ε = random experimental error. Analysis of variance was performed and statistical differences were detected by Duncan mean comparisons ($P < 0.05$) using Infostat (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Gonzalez, Tablada, & Robledo, 2008).

4.3 Results

The data of Table 4-1 show the chemical composition of *Tithonia diversifolia* and *Pennisetum purpureum* used in the study. TD confirmed its role as source of protein, while the grass was the source of fiber i.e. a higher percentage of NDF and ADF in PP versus a

higher protein content in TD was observed. Interestingly, WSC was slightly higher in TD whereas IVDDM in both forages were similar. However, the WSC/BC ratio confirmed the higher ensilability of the grass, derived from its smaller buffering capacity, i.e., the high buffering capacity of TD limits its ensilability.

Tabla 4-1. Chemical composition (DM base) of *Tithonia diversifolia* and *Pennisetum purpureum* evaluated in the Rostock Fermentation Test

Parameter	Unit	<i>T. diversifolia</i>	<i>P. purpureum</i>
OM	(g/kg)	870.9±0.4	860.5±0.5
DM	(g/kg)	280.0±1.4	170.2±1.4
Ash	(g/kg)	120.1±0.4	130.5±0.1
CP	(g/kg)	160.9±0.1	50.0±0.2
NDF	(g/kg)	410.6±1.1	630.5±0.3
dNDF	(g/kg)	270.1±2.1	330.9±2.1
ADF	(g/kg)	280.1±1.4	400.9 ±1.6
WSC	(g/kg)	230.4±0.6	210.2±1.9
BC	(g lactic acid/100 g DM)	8.4±0.6	3.1±0.2
WSC/BC	-	2.80±0.2	6.70±1.1
IVDDM	%	67.0±1.3	66.0±0.3
FC	-	49.6	71.2

OM=Organic matter; DM= Dry matter; CP=Crude protein; NDF= neutral detergent fiber; dNDF= digestible neutral detergent fiber; ADF=acid detergent fiber, WSC=Water soluble carbohydrates WSC; BC=Buffering capacity; IVDDM= *in vitro* digestibility of dry matter; ± standard deviation; FC= fermentation coefficient. FC = DM (g/100 g) + 8 WSC/BC. *Authors personal copy*

Preliminary Rostock Fermentation Test (RFT)

The cultured epiphytic bacteria strains isolated from TD were identified as *Lactobacillus paracasei* (T735) and *L. plantarum* (T732, T733, T734), respectively. In this assessment, neither the control nor any of the epiphytic LAB strains tested, achieved a pH below 4.0 at 20 hours. However, T735 strain (*L. paracasei*) showed the best acidification potential among the native isolates after 48h (Table 4-2).

Therefore, this was selected for further evaluations in experiment 1 and 2. The rest of the bacterial strains were discarded from further evaluations.

Tabla 4-2. Acidification potential of epiphytic strains isolated from *Tithonia diversifolia* (TD) against a blend of lactic acid-fermenting bacteria (BLB) * inoculum enriched with sucrose (S) in a preliminary test

	Control (n=3)	T732 (n=3)	T733 (n=3)	T734 (n=3)	T735 (n=3)	BLB (n=3)	<i>P</i> -
20h	5.5±0.1b	5.3±0.2b	5.3± 0.1b	5.4±0.2b	5.3±0.1b	4.1±0.0a	0.0001
48h	5.8±0.5b	4.6±0.2b	4.6±0.6ab	5.1±0.5ab	4.5±0.4ab	4.0±0.0 a	0.3348

Control = TD + S without inoculum; T732= TD + S + T732 (*L. plantarum*); T733= TD + S + T733 (*L. plantarum*), T734 = TD + S + T734 (*L. plantarum*); T735= TD + S + T735 (*Lactobacillus paracasei*). (BLB) = blend based on *Streptococcus faecium* (CNCM I-3236), *L. plantarum* (CNCM I-3235), *Pediococcus acidilactici* (CNCM I-3237) and *L. salivarius* (CNCM I-3238).

Experiment 1.

The T735 (epiphytic bacteria from TD and C727 (from CIAT's LAB collection) inocula lowered the silage pH with statistical differences ($P<0.05$) in relation to the control (TD without inoculum) after 20 h onwards. In line with these results, a statistical difference was found between T735 and C727 to (BLB) from 28 to 48 h of incubation. BLB and control treatments showed the worst pH development during the RFT. The pH measurement with T735 was maintained at 3.6 at the end of the assay, presenting the lowest acidity, however, was not different statistically from treatments inoculated with C726 and C727 (Table 4-3).

Tabla 4-3. Development of pH during the Rostock Fermentation Test (RFT) for *Tithonia diversifolia* (TD) using different ephyphytic lactic acid bacteria strains enriched with sucrose (S) in experiment 1.

Treatment	Acidity (pH)				
	0h	20h	28h	44h	48h
TD + S (control)	6.9 ±0.1	4.1±0.0b	4.3±0.0b	3.9±0.1b	3.8±0.1c
TD + S + C726	7.1±0.0	3.9±0.0ab	3.7±0.0a	3.7±0.0a	3.7±0.0ab
TD + S + C727	7.1±0.0	3.9±0.0ab	3.8±0.0a	3.7±0.0a	3.7±0.0a
TD + S + T735	6.9±0.1	3.8±0.1a	3.7±0.0a	3.6±0.0a	3.6±0.0a
TD + S + BLB	7.0±0.1	4.1±0.0b	4.2±0.0b	3.9±0.1b	3.8±0.1bc

Different letters in the same column mean significant differences between treatments ($P<0.05$). (BLB) = blend of lactic acid-fermenting bacteria based on *Streptococcus faecium* (CNCM I-3236), *L. plantarum* (CNCM I-3235), *Pediococcus acidilactici* (CNCM I-3237) and *L. salivarius* (CNCM I-3238).

Experiment 2.

Within the first 20 h, blends with a high proportion of grass stimulated rapid acidification. The pH value ranged from >6 at 0 hours, to 3.6-3.8 in 100% PP, compared to 4.6-4.9 in

100% (TD) (Table 4). The data suggest that acidification is faster as the proportion of the grass increases ($P < 0.01$). The T735 strain per se was successful in reducing pH. The combination of TD and (BLB) did not bring any further advantage compared to TD alone. There was no independent effect of combining PPxInoculant ($P = 0.44$) at any time.

4.4 Discussion

T. diversifolia is a non-legume forage recognized as a source of protein (Orozco, Ruíz, Rodríguez, Valenciaga, Gutiérrez, Arzola, González, La O. & Castillo, 2009; Fasuyi & Ibitayo, 2011), however, in this study we found that can be also an important source of WSC comparable to PP. The analysis of fiber fractions indicates larger values in PP biomass than TD. These findings take relevance since FDN and FDA parameters are closely related to animal performance (e.g. milk yield and live weight gain), because influence directly animal intake and digestibility of forages (La O et al., 2009). The evaluation of the *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) of TD was lower than the (La O, González, Orozco, Castillo, Ruiz, Estrada, Ríos, Gutiérrez, Bernal, Valenciaga, Castro, & Hernández, 2012) reported values, but are at the level of other tropical legumes (Heinritz, Martens, Avila & Hoedtke, 2012).

On the other hand, PP presented a similar IVDDMD (66%) values to other tropical grasses (Martens, et al., 2012). Therefore, blending both forages will not only benefit acidification and fermentation parameters for silage making, but also the digestibility and the intake of silage by animals with feasible improved productivity.

Epiphytic LAB strains isolated from tropical silages are promising candidates to be used as silage additives (Heinritz, et al., 2012). However, it is important to identify strains with the capacity to favor lactic fermentation (homofermentative strains) in the target forage. Here, the employment of 735 LAB (*L. paracasei*) isolated from TD, improved lactic acid fermentation of TD and PP mixtures, followed by more acidic pH values.

Acidification of the medium below pH 4 is important because it reduces proteolysis from enzymatic activity and chemical hydrolysis (Rooke & Hatfield, 2003). Furthermore, the acidic medium inhibits the growth of enterobacteria, which are undesirable for the hygienic quality of silage (Pahlow, Muck, & Driehuis, 2003). It is important to notice that *L. paracasei*

is a recognized strain to improve the ensiling process and it is considered safe by the European Food Safety Authority (EFSA, 2013).

For forage ensilability, buffering capacity (BC) is a critical parameter to achieve good silage quality. It is accepted that BC is high for high-protein feeds and legumes whereas it is low for energetic feeds and low-intermediate BC for low-protein feeds and grass forages (Otthuis, et al., 1994b; Levic, Prodanovic & Sredanov, 2005). Therefore, BC seems to be the determinant factor to limit the ensilability of TD as the WSC content in the present study were similar to PP (23.4% v.s 21.2% for TD and PP, respectively). Our results indicate that the epiphytic strain T735 was potentially efficient to induce a pH drop and to increase lactic fermentation in blends with high proportion of PP (Table 4-3). This suggests that acidification is easiest when blends contain a high proportion of grass.

The increase of grass in the mixtures probably reduced the buffering capacity of TD. (Martens et al., 2013) demonstrated that the use of readily available carbohydrates in combination with selected lactic acid bacteria strains could improve the fermentation of tropical forages. Thus, the combination of LAB and sucrose generally bring the fastest and most effective reductions of pH in most grasses (Zierenberg et al., 2001). In the present study, the epiphytic strain of TD (T735) in the forage enriched with sucrose was potentially efficient to induce a pH drop and to increase lactic fermentation in those blends (Table 4-3).

In line with these results, the ratio WSC/BC of TD indicates its low suitability for ensiling. On the contrary, PP grass and high grass proportion of blends were much more suitable for ensiling due to their favorable WSC/BC ratio. The fermentation coefficient (FC), which indicates the high ensilability of both TD and PP, demonstrated a significant advantage for the grass in comparison to TD (49.6 and 71.2 for TD and PP, respectively). Weissbach, Schmidt & Hein (1974) suggests that if the FC is below 35, the material is difficult for ensiling. Heinritz, et al. (2012) found a satisfactory FC in Mulato II (*Brachiaria ruziziensis* x *B. brizantha* x *B. decumbens*) grass (FC=52), with better results with the addition of LAB (FC=65), contrasting to the low FC average for tropical forage legumes (FC=39). This finding helps to explain why pH values are lower in mixtures with a higher percentage of PP. Therefore, the pH of grass blends (PP plus TD) was lower than in silage of TD alone

(Table 4-4). Favoring high WSC/BC ratio either by the increasing WSC content or by reducing BC would benefit the ensilability of TD.

Tabla 4-4. Development of pH during the Rostock Fermentation Test for *Tithonia diversifolia* alone or with *Pennisetum purpureum* using different lactic acid bacteria strains in experiment 2.

Aditive	TD/PP	pH				
		0h	20h	28h	44h	48h
Control	0/100	5.9 ± 0.0a	3.8 ± 0.0ab	3.8 ± 0.0abc	4.0 ± 0.3abcde	3.7 ± 0.0abc
Control	33/67	6.5 ± 0.0b	4.3 ± 0.0cdef	4.1 ± 0.1bcd	3.7 ± 0.0abc	3.6 ± 0.0ab
Control	67/33	6.8 ± 0.1cde	4.7 ± 0.0fgh	4.7 ± 0.0ef	4.2 ± 0.1bcdf	4.2 ± 0.1cdef
Control	100/0	7.1 ± 0.0e	4.9 ± 0.1h	5.0 ± 0.1f	4.7 ± 0.1f	4.6 ± 0.1fgh
T735	0/100	6.0 ± 0.0a	3.7 ± 0.1a	3.7 ± 0.1ab	3.4 ± 0.1a	3.4 ± 0.1a
T735	33/67	6.6 ± 0.0c	3.9 ± 0.0abc	3.8 ± 0.1abc	3.6 ± 0.1ab	3.6 ± 0.1ab
T735	67/33	6.8 ± 0.1cde	4.2 ± 0.1cde	4.1 ± 0.1cd	3.9 ± 0.1abcd	3.9 ± 0.1bcd
T735	100/0	7.1 ± 0.0e	4.6 ± 0.1efgh	4.4 ± 0.1de	4.3 ± 0.2cdef	4.3 ± 0.2defg
BLB	0/100	5.9 ± 0.1a	3.7 ± 0.2ab	3.7 ± 0.3abc	3.9 ± 0.3abcd	3.7 ± 0.3abc
BLB	33/67	6.6 ± 0.1c	4.1 ± 0.1bcd	4.1 ± 0.0cd	3.9 ± 0.3abcd	4.2 ± 0.1cde
BLB	67/33	6.8 ± 0.0cde	4.4 ± 0.3defg	4.4 ± 0.3de	4.4 ± 0.2def	4.4 ± 0.2efgh
BLB	100/0	7.1 ± 0.0e	4.8 ± 0.3h	4.8 ± 0.3ef	4.6 ± 0.4ef	4.8 ± 0.2h
T735+	BLB 0/100	6.2 ± 0.4a	3.6 ± 0.0a	3.5 ± 0.0a	3.4 ± 0.1a	3.5 ± 0.1ab
T735+ BLB	33/67	6.6 ± 0.0cd	3.9 ± 0.0abc	3.8 ± 0.1abc	3.7 ± 0.2abc	3.8 ± 0.2abc
T735+ BLB	67/33	6.9 ± 0.0de	4.4 ± 0.3defg	4.3 ± 0.3de	4.3 ± 0.3bcdf	4.3 ± 0.3defg
T735+ BLB	100/0	7.0 ± 0.2e	4.7 ± 0.1gh	4.7 ± 0.2ef	4.7 ± 0.2f	4.7 ± 0.2gh

4.5 Conclusion

T. diversifolia (TD) ensilability can be improved by the addition of LAB epiphytic bacteria. Mixtures of TD with *P. purpureum* (PP) improve ensilability of TD. Larger amounts of PP facilitate the ensilability of TD. In further studies, TD and PP will be ensiled on a larger scale with different proportions and different LAB inocula to verify the findings from the *in-vitro* experiments.

Acknowledgments

The authors acknowledge the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) and the University of Tolima for the technical and financial support. Especially, the technical support by Patricia Avila, Steven Quintero and Orlando Trujillo from the Forage Quality Laboratory

of CIAT and Ms. Clemencia Fandiño from the Clinical laboratory of Tolima University is acknowledged.

4.6 References

- Association of Official Agricultural Chemists. (2010). *Fiber (acid detergent) and lignin (H₂SO₄) in animal feed*. Gaithersburg, MD, USA.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- European Food Safety Authority (2013). Scientific opinion on the safety and efficacy of *Lactobacillus paracasei* (NCIMB 30151) as a silage additive for all animal species. *EFESA Journal*, 11(5), 3611. doi:10.2903/j.efsa.2013.3219
- Fasuyi, A.O. & Ibitayo, F.J. (2011). Nitrogen balance and morphometric traits of weanling pigs fed graded levels of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaf meal. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 11(5), 1-17. doi.org/10.4314/ajfand.v11i5.70441
- Heinritz, S., Martens, S.D., Avila, P. & Hoedtke, S. (2012). The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology*, 174(3-4), 201-210. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.017
- Herrera Flores, T.S., Ortíz Cereceres, J., Delgado Alvarado, A. & Acosta Galleros, J.A. (2014). Contenido de osmoprotectores, ácido ascórbico y ascorbato peroxidasa en hojas de frijol sometidas a estrés por sequía. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5), 859-870. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v5n5/v5n5a11.pdf>
- Ibrahim, M., Franco, M., Pezo, D.A., Camero, A. & Araya, J.L. (2001). Promoting intake of *Cratylia argentea* as a dry season supplement for cattle grazing *Hyparrhenia rufa* in the subhumid tropics. *Agroforestry Systems*, 51, 167-175. doi:10.1023/A:1010659405632
- Jama, B., Palm, C.A., Buresh, R.J., Niang, A., Gachengo, C., Nziguheba, G. & Amadalo, B. (2000). *Tithonia diversifolia* as a green manure for soil fertility improvement in western Kenya: A review. *Agroforestry Systems*, 49, 201-221.
- La O, O., González, H. Orozco, A., Castillo, Y., Ruiz, O., Estrada, A., Ríos, F., Gutiérrez, E., Bernal, H., Valenciaga, D., Castro, B.I. & Hernández, Y. (2012). Chemical composition, in situ rumen degradability, and *in vitro* digestibility of *Tithonia diversifolia* ecotypes of interest for ruminant feeding. *Revista Cubana Ciencia Agrícola*, 46(1), 47-53.

- Levic, J., Prodanovic, O. & Sredanov, S. (2005). Understanding the buffering capacity in feedstuffs. *Biotechnology in animal husbandry*, 21, 308-313.
- Lukač, B., Kramberger, B., Meglič, V. & Verbič, J. (2012). Importance of non-leguminous forbs in animal nutrition and their ensiling properties: a review. *Žemdirbystė =Agriculture*, 99(1), 3-8.
- Martens, S., Tiemamm, T., Bindelle, J. & Peters, M. (2012). Alternative plant protein sources for pigs and chicken in the tropics – nutritional value and constraints: a review. *Journal of Agricultural and Rural Development in the tropics and subtropics* 113(2), 101-123
- Martens, S.D., Hoedtke, S., Avila, P., Heinritz, S.N. & Zeyner, A. (2013). Effect of ensiling treatment on secondary compounds and amino acid profile of tropical forage legumes, and implications for their pig feeding potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1107-1115.
- Moore, J.E. (1970). Procedures for the two-stage *in vitro* digestion of forages. In Harris, L.E. Nutrition research techniques for domestic and wild animals, Vol. 1. Logan: Utah State University
- Nero, L.A., Beloti, V., Barros, M.A.F., Ortolani, M.B.T, Tamanini, R. & Franco, B.D.G.M. (2006). Comparison of Petrifilm aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 14, 249–257.
- Nhan, N.T.H., Hon, N.V. & Preston T.R. (2011). Studies on ensiling of *Tithonia diversifolia* and Taro (*Colocasia esculenta*) and feeding the silage to fattening pigs as partial replacement of a basal mixtures of rice bran, broken rice, soybean meal and fish meal. *Livestock Research for Rural Development*. 23(5).
- Orozco, A., Ruíz, O., Rodríguez, C., Valenciaga, D., Gutiérrez, E., Arzola, C., González, H., La O, O. & Castillo, Y. (2009). Effect of the combination of *Tithonia diversifolia* and (PP) VC. Cuba CT-115 in the kinetics and gas production *in vitro*. (In Spanish) Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y (PP) vc. Cuba CT-115 en la cinética y producción de gas *in vitro*. *Revista Cubana Ciencia Agrícola*, 43(2),149-152.
- Othuis, W., Luo, J. & Bergveld, P. (1994). Characterization of proteins by means of their buffering capacity, measured with an ISFET- based colorimetric sensor-actuator system. *Biosens. Bioelectron*, 9, 743-751.
- Pahlow, G., Muck, R. E., & Driehuis, F. (2003). Microbiology of ensiling. En D. R. Buxton, R. E. Muck, & J. Harrison (Eds.), *Silage science and technology* (pp. 31–93). Madison: American Society of Agronomy.
- Rooke, J. A., & Hatfield, R. D. (2013). *Biochemistry of Ensiling*. Nebraska.
- Sonka, D. (1997). *Tithonia* weed- A potential Green manure crop. *Echo Development Notes*, 57, 5-6.

- Telley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops Current Contents. *Journal of the British Grassland Society*, 18, 104–111.
- Titterton, M. & Bareeba, F.B. (2001). Ensiling of grasses and legumes in the tropics. *Ensilaje de gramíneas y leguminosas en los trópicos* (In spanish). En. L.'t Mannelje (Ed.) *Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos*. (pp. 43-53). Roma: FAO.
- Van Soest, P.J. & Robertson, J.B. (1985). *Analysis of forage and fibrous foods. A laboratory manual for animal science 613*. Ithaca, New York, USA: Cornell University.
- Weissbach, F. (1967). The determination of the buffer capacity of the forage plants and their importance for the assessment of fermentability. (In german) *Die Bestimmung der Pufferkapazität der Futterpflanzen und ihre Bedeutung für die Beurteilung der Vergärbarkeit*. Tagungsbericht, *Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR* 92, 211-220.
- Weissbach, F., Schmidt, L., Hein, E. (1974). Method of anticipation the run of fermentation in silage making, based on the chemical composition of green fodder (pp. 226-236). In *Proceedings of the 12th International Grassland Congress*. Techniques and Forage Conservation and Storage, Moscow.
- Wyss, U. & Vogel, R. (1999). Ensiling ability of forbs/herbs of intensive used swards. (In German) *Siliereignung von Kräutern aus intensiven Beständen*. *Agrarforschung Schweiz*, 6(5), 185-188.
- Zierenberg, B. (2000). *In vitro Methode zur Beurteilung der Fermentationsleistung von Milchsäurebakterien und deren Einfluss auf die Stoffwechselaktivität weiterer für die Silierung relevanter Mikroorganismen bei unterschiedlichen Fermentationsbedingungen* (*In vitro* method for assessing the performance fermentation of lactic acid bacteria and their influence on the metabolic activity of other relevant for silage microorganisms at different fermentation conditions). (PhD thesis). University of Rostock, Germany.
- Zierenberg, B., Friedel, K., Glatzle, A. & Chudy, A. (February 2001). Assessment of ensilability of six tropical grasses using three different approaches. In *XIX International Grassland Congress*. (pp. 21-23). Piracicaba, Brazil.

5. Estabilidad aeróbica del ensilaje de *Pennisetum purpureum* con diferentes niveles de inclusión de *Tithonia diversifolia*.

V.A. Holguín^{1,2}, H.M. Cuchillo^{3,4}, J. Mazabel³, S. Quintero³ and J. Mora-Delgado².

¹ Universidad Nacional de Colombia, Palmira. A.A 237, Palmira – Colombia; ² Grupo de Investigación Sistemas Agroforestales Pecuarios, Universidad del Tolima, A.A. 546, Ibagué – Colombia ³ Centro internacional de Agricultura Tropical (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia. ⁴ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, 14000 D.F, Mexico.

Email para correspondencia: vholguin@ut.edu.co

Resumen

Los ensilajes son aeróbicamente estables si después de la apertura, cuando se expone al aire, siguen siendo en gran medida inafectados por microorganismos causantes de deterioro como mohos y levaduras. Para la prueba de estabilidad aeróbica, se prepararon los micro-ensilajes de un kilo de mezclas de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum purpureum*. (T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100). Fueron introducidos en contenedores de poliestireno, de 60 mm de espesor. Simples termómetros interior-exterior min-max digitales se utilizaron para medir la temperatura de ensilajes (sensor para el exterior se introduce en el material ensilado) y la temperatura ambiente al mismo tiempo. Cada micro-ensilaje fue asignado a un termómetro durante la prueba. El sensor del termómetro, que estaba en contacto con el material ensilado, fue desinfectado después de cada ejecución de prueba con un desinfectante especial contra cualquier tipo de hongos y bacterias. A una temperatura ambiente de 23°C en promedio, se midió la temperatura a lo largo de siete días, tres veces al día, por la mañana a las 8, a las 12 del mediodía y por la tarde a las 16.

Además, la temperatura máxima durante la noche fue registrada. Se calcularon las 24 h promedio de temperatura ambiente. Para la evaluación de ensilajes después de la prueba de estabilidad aeróbica, se utilizó la instrucción de acuerdo con la "Nota Visual de

ensilajes", en donde se da la siguiente puntuación: 0 (libre de moho y levaduras) a 4 (totalmente podrida). El papel de *T. diversifolia* es notable una vez que el ensilado entra en el período de exposición aeróbica, en la medida en que el aumento de la capacidad tampón tiene un efecto mayor en tamponar el cambio de pH una vez abierto el silo. Por lo tanto, una mayor estabilidad para el efecto de la fermentación aerobia que se produce en los ensilajes con una mayor proporción de *T. diversifolia*.

Palabras clave: Capacidad buffer; Acidez; Variación térmica; Deterioro aeróbico

Abstract

Silages are aerobically stable if after opening, when exposed to air, they remain largely unaffected by spoilage microorganisms like moulds and yeasts. For the aerobic stability test, micro-silages of one kg were prepared mixtures of *Tithonia diversifolia* and *Pennisetum purpureum*. (T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100). They were introduced in polystyrene containers, 60 mm thick. Simple digital indoor out or min-max thermometers were used to measure the temperature of silages (sensor for outside was introduced into the silage material) and ambient temperature at the same time. Each micro-silage was assigned to one thermometer during the test. The sensor of the thermometer, which was in touch with silage material, was disinfected after each test-run against any kind of fungi and bacteria. At a room temperature of 23°C on average, silage temperature was measured along seven days, three times a day, in the morning at 8 am, midday at 12 and in the afternoon at 4 pm. Besides, the maximum temperature during the night was registred. The 24 h average of ambient and silage temperature was calculated. For the evaluation of silages after an aerobic stability, "Visual rating of silages" test was used, where points are given from 0 (free of mould and yeasts) to 4 (totally spoiled). The role of *T. diversifolia* is noticeable once the silage during the aerobic period. TD increased buffer capacity and keep pH steady after air exposure. Thus, greater stability to the effect of aerobic fermentation occurs in silages with a higher proportion of TD

Keywords: Buffer capacity; Acidity; Thermal variation; Aerobic spoilage

5.1 Introducción

Los ensilajes se consideran aeróbicamente inestables si después de abrirlos, es decir, en el momento de la exposición aeróbica, son afectados por microorganismos causantes de

deterioro como mohos y levaduras (Wilhelm & Wurm, 1999). Después de que los silos se abren para su uso, el aire penetra y promueve el crecimiento de microorganismos aeróbicos ácido tolerantes y comienza la oxidación de los productos de fermentación presente en el ensilaje, causando deterioro aeróbico y puede dar lugar a sustancias potencialmente tóxicas o microorganismos indeseables (Danner, Holzer, Mayjuber & Braun, 2003).

Si estos microorganismos encuentran condiciones de crecimiento favorables, podrían causar pérdidas de MS y nutrientes. Indicador de la actividad microbiana es el aumento constante de la temperatura, de tal manera que la estabilidad aeróbica se puede medir por medio de un aumento de este parámetro. Así, cuando la temperatura de ensilajes eleva persistentemente 3°C por encima de la temperatura ambiente, la muestra se considera como aeróbicamente inestable y ha comenzado a deteriorarse (Pahlow, Honig, & Martens, 2004). El deterioro aeróbico de ensilajes sigue siendo un gran problema para la conservación de la calidad de los ensilajes, especialmente por la presencia de microorganismos que causan fermentación alcohólica que incluyen levaduras y mohos lactato asimiladores (Pahlow, 1991).

La estabilidad de los ensilajes contra el deterioro aeróbico puede variar significativamente, sin embargo, los mecanismos para prolongar la resistencia al deterioro aeróbico son variados. Bacterias ácido lácticas heterofermentativas muestran un efecto positivo en la estabilidad aeróbica, ya que producen ácido acético y parcialmente propanodiol en el segundo medio de fermentación (Ruser & Kleinman, 2005), lo que ayuda a conservar el ensilaje cuando se expone al aire.

En los últimos años, una BAL heterofermentativa, como *Lactobacilos buchneri*, se ha estudiado como un aditivo para mejorar la estabilidad aeróbica de los ensilajes (Muck 1996), pero otras estrategias podrían emplearse para disminuir el deterioro, como la acción de mezclas de especies de gramíneas con otras plantas forrajeras que tengan la capacidad de producir altas concentraciones de ácido láctico en la fermentación aeróbica y con una capacidad buffer alta que mantengan un pH bajo una vez que el silo es abierto (Mendieta–Araica, Spörndly, Reyes-Sánchez, Norell & Spörndly, 2009)

Según Heinritz, Martens, Avila, & Hoedtke (2012), los ensilajes son aeróbicamente estables si después de la exposición al aire mantiene una temperatura interna que no supera los 3°C de diferencia respecto a la temperatura ambiente. De hecho, el aumento de la temperatura es el resultado de un incremento en la actividad microbiana causante de deterioro, entre los cuales sobresale la actividad de mohos y levaduras (Wilhelm & Wurm, 1999) que pueden causar pérdidas de MS si encuentran condiciones de crecimiento favorables.

En los trópicos, la inestabilidad aeróbica puede causar problemas con la alimentación de los animales, por lo tanto ensilaje debe hacerse en cantidades acordes para ser abierto y alimentado a cabo en un corto período de tiempo de acuerdo con el tamaño de la granja (Mannetje, 2000). El principal objetivo de este experimento fue evaluar el efecto sobre las características de fermentación cuando *T. diversifolia* (TD) se introduce en diversas proporciones al ensilaje de *P. purpureum* (PP). Se pone especial atención a las pérdidas derivadas y la estabilidad aeróbica de los ensilajes. Se parte de la hipótesis que la introducción de *T. diversifolia*, como un componente de ensilado para mejorar el valor nutricional del ensilaje, mejora también la estabilidad aeróbica del ensilaje.

5.2 Materiales y Métodos

La prueba de estabilidad aeróbica se realizó siguiendo los protocolos descritos por Honig, (1990) y Pahlow et al. (2004). Se usaron microsilos de un kg. Los tratamientos se ensilaron, en bolsas sellados al vacío por triplicado. Se almacenaron a aproximadamente 25°C durante 90 d. Los ensilajes se liofilizaron. Los forrajes de *T. diversifolia* y *P. purpureum* fueron dispuestos en cuatro diferentes proporciones (T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100), materia fresca (FM) Base. Un diseño experimental completamente al azar fue utilizado, con 12 tratamientos y tres repeticiones para cada tratamiento.

Los ensilajes fueron destapados e introducidos en termocuplas de 60 mm de espesor. Cada una fue equipada con termómetros mín-máx interior-exterior digital simple (IN – OUT THERMO, infactory, precisión 0.5 y 0.1°C resp.) para medir la temperatura de ensilajes y temperatura ambiente a la misma hora. A cada termocupla se le asignó un termómetro durante la prueba. El sensor del termómetro, que estaba en contacto con el material

ensilado, fue desinfectado después de cada toma de datos con alcohol al 70%. Se midió la temperatura del ensilaje durante siete días seguidos tres veces al día (8, 12 y 16 horas)

Los micro-ensilajes se monitorearon a una temperatura ambiente de 24°C en promedio, además del registro de la temperatura máxima durante la noche. Para la evaluación de ensilajes, después de una prueba de estabilidad aeróbica, se utilizó los criterios elaborados de acuerdo con (Cárdenas, Solorio & Sandoval, 2004); (Betancourt, 2001); (Villalba, Holguín & Piñeros, 2011), sintetizados en la Tabla 5-1 en la cual se dan puntos de 0 (Estado ideal) a 4 (estado deteriorado). Después de la prueba, se tomó el pH y la MS a 105°C.

Todos los microsilos fueron abiertos y se analizaron 90 días después de la preparación. El contenido de cada microsilo fue transferido a una bolsa de plástico, se mezcló a fondo y a continuación se tomaron muestras para su análisis.

Los análisis bromatológicos de calidad nutricional se efectuaron siguiendo las normas AOAC 930.15, NFTA Method 2.1.4 para determinación de Materia seca en horno a 105°C , AOAC 973.18, NFTA Method 4.1 para Fibra detergente Ácida (FDA) (Shreve, Thiex & Wolf, 2006; Van Soest, Robertson & Lewis, 1991) para fibra detergente Neutra (FDN), (Tilley & Terry, 1963) modificado por Moore (1970) para la metodología de Digestibilidad in vitro de la MS y para la determinación de proteína cruda (PC) por Kjeldahl se aplica la norma AOAC 984.13.

5.2.1 Análisis Estadístico

Para el análisis de las características bromatológicas se verificó la normalidad en los datos y la homogeneidad de varianzas en las muestras. Para comparar las medias entre los tratamientos en cada variable se realizó un análisis de varianzas. En caso de detectarse diferencias estadísticamente significativas se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se analizó el comportamiento de las variables en el tiempo (apertura y día 7 de exposición aeróbica) realizando la prueba t de Student para datos pareados. Para el análisis de las características organolépticas se realizaron tablas de contingencia con las frecuencias y porcentajes en los diferentes tratamientos, según criterios del grado de

alteración del ensilaje según clasificación expresados en la tabla 5-1. El análisis se realizó con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Gonzalez, Tablada, Robledo, 2008).

Tabla 5-1. Clave para indicadores organolépticos según grado de alteración de la calidad de ensilajes

	Nulo (0)	Débil (1)	Claro (2)	Intenso (4)
Olor Putrefacto	No perceptible	Olor débil, sin o con frotamiento	Claramente perceptible desde 1 m.	Intensamente perceptible a distancia (olor fecal)
Olor Vinagre	No perceptible	Olor débil, sin o con frotamiento	Claramente perceptible desde 1 m.	Intensamente perceptible a distancia (penetrante)
Olor Quemado	No perceptible	Olor agradable débil,	Claramente perceptible (olor a humo).	Intensamente perceptible (olor a quemado desagradable)
Olor Achololico	No perceptible	Olor agradable débil,	Claramente perceptible.	Intensamente perceptible (alcohol)
Color Oscurecimiento	Verde aceituna (normal)	Ligeramente oscurecido	Verde oscuro	Intensamente oscurecido o negro total
Color Decoloración	Color normal	Ligeramente amarilloso	Decolorado	Intensamente decolorado
Textura	Parte de plantas no afectadas, contornos definidos	Partes de las plantas ligeramente afectadas en los bordes cortados	Hojas claramente afectadas, bordes definidos	No se diferencia entre con hojas y tallos, forman masa amorfa jabonosa al tacto, podridas

Fuente: Elaboración propia con base a Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, DLG, 2004; Cárdenas et al., 2004; Betancourt, 2001; Villalba et al., 2011

5.3 Resultados

5.3.1 Análisis Químico

En la apertura de los microsilos (90 días), los ensilajes no mostraron signos visibles de enmohecimiento. Los resultados de los análisis químicos de los ensilajes se presentan en la Tabla 5-2. El ANDEVA indica que hubo diferencias significativas entre tratamientos e inóculos. La diferencia de medias en la interacción solo fue significativa para PC y NH₃-N ($p < 0.05$).

Se obtuvo niveles más bajos de MS ($p < 0.05$) a medida que se aumenta el nivel de inclusión de PP, siendo más bajos los valores en los ensilajes que contienen PP al 100%; no se presentó efecto del inóculo (p valor 0.2181).

En cuanto a la PC, a medida que el nivel de inclusión de PP en el ensilaje aumento se obtuvo niveles más bajos de proteína ($p < 0.05$). Por lo tanto, los valores de PC fueron más altos en los ensilajes que contienen TD al 100%; cabe señalar que en este nivel de inclusión, la adición de inóculo no presentó ningún efecto favorable. El ensilaje sin inóculo presentó los más altos valores de PC (p 0.0040). Se observó un patrón similar de valores de PC en el T2 (nivel de inclusión de TD/PP, 67/33), pero con un efecto significativo del inóculo.

Le siguen los ensilajes de T3 (33% de TD), que mostraron niveles de PC entre 8.4 a 9.0, sin diferencias significativas en las diferentes cepas. Los ensilajes del T4 (100% de PP) presentaron los niveles más bajos de PC, con diferencias significativas respecto a los otros niveles de inclusión, pero sin diferencias en el efecto del inóculo.

Los niveles de FDA se incrementan en la medida que aumenta la proporción de PP con diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) y entre inóculos ($p = 0.0009$), pero el efecto de la interacción no fue significativo ($p > 0.05$). En el tratamiento T1 se evidencia una diferencia de medias generada por efecto del inóculo, con ventaja para los tratamientos inoculados con cepas (T735 y SIL-ALL^{®4x4}) respecto al tratamiento no inoculado. Similar tendencia se observó para FDA. El mayor contenido de las fibras se explica por la naturaleza de las materias primas involucradas en la mezcla, a medida que se incrementa el nivel de inclusión de PP la proporción de FDN y FDA se incrementa, dada la composición química de las plantas C4 de poseer una pared celular mucho más gruesa y menor contenido celular del mesofilo que las plantas tipo C3 (Fernández, 2015) al cual pertenece *T. diversifolia*.

Los valores de $\text{NH}_3\text{-N}$ sugieren una tendencia de mayor presencia de este metabolito a medida que el componente de mayor calidad proteica es mayor con diferencias estadísticas significativas por efecto del tratamiento, los inóculos y las interacciones ($p < 0.0001$). Lo cual se explica por un mayor proceso de proteólisis en los ensilajes con

mayor proporción de TD. También la presencia del inoculo indica un efecto positivo sobre la reducción de protolisis, especialmente el efecto de T735, la que en el tratamiento T1 reduce significativamente la presencia de NH₃-N como resultado de procesos proteolíticos.

Tabla 5-2. Valor nutritivo de ensilaje de mezclas de *T. Diversifolia* y *P. purpureum*

Tratamientos	Inóculos	MS (%)	PC (%)	FDN (%)	FDA (%)	N-NH ₃
T1	T735	28.0ef	16.8 de	34.9 a	23.1 a	0.1 ab
	Silall	29.6f	15.9 d	34.7 a	24.4 a	0.2 bc
	-	27.6def	18.1 e	38.6 b	28.1 b	0.4 e
T2	T735	25.8cd	12.7 c	40.8 bc	28.3 b	0.1 ab
	Silall	26.8de	12.3 c	41.7 bc	28.7 b	0.2 cd
	-	24.6bc	15.1 d	43.3 c	29.9 b	0.2 d
T3	T735	23.8b	8.6 b	49.1 d	33.4 c	0.1 a
	Silall	22.8b	9.0 b	49.3 d	33.9 c	0.1 abc
	-	23.8b	8.4 b	48.8 d	34.4 c	0.2 bc
T4	T735	18.0a	5.3 a	57.3 e	38.2 d	0.1 a
	Silall	18.2a	5.1 a	57.9 e	38.3 d	0.1 a
	-	19.8a	5.1a	57.9 e	39.1 d	0.1 ab

T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100

Calidad organoléptica del ensilaje de 90 días

Al momento de la apertura del ensilaje, después de 90 días de fermentación anaeróbica, los tratamientos presentan diferencias significativas en algunos indicadores de calidad ($P < 0.05$), sin embargo, el efecto de los inóculos no fue significativo ($p > 0.05$). La Tabla 5-3 muestra las distribuciones para las diferentes características organolépticas como olor, color y textura; en cada uno de los tratamientos. Los valores de las escalas en cada uno de los parámetros analizados están dentro de los niveles de buena calidad del ensilaje. De hecho, la mayor parte del puntaje asignado por los evaluadores estuvo en las categorías de un efecto nulo u débil, lo cual indica que los ensilajes no presentaron alteraciones indeseables y estas calificaciones equivalen a categorías de excelente o bueno en otros sistemas de valoración Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, (DLG, 2004); Cárdenas et al., (2004); Betancourt, (2001); Villalba et al., (2011).

Tabla 5-3. Distribuciones de las diferentes características organolépticas de microensilajes

	Efecto	Frecuencia	Tratamientos			
			1	2	3	4
Olor (vinagre)	Nulo (0)	Abs.	12	12	12	12
		Rel.	100	100	100	100
	Débil (1)	Abs.	0	0	0	0
		Rel.	0	0	0	0
Olor (putrefacto)	Nulo (0)	Abs.	12	12	12	12
		Rel.	100	100	100	100
	Débil (1)	Abs.	0	0	0	0
		Rel.	0	0	0	0
Olor (Quemado)	Nulo (0)	Abs.	12	12	12	12
		Rel.	100	100	100	100
	Débil (1)	Abs.	0	0	0	0
		Rel.	0	0	0	0
Olor (Alcohol)	Nulo (0)	Abs.	10	12	12	12
		Rel.	83	100	100	100
	Débil (1)	Abs.	2	0	0	0
		Rel.	17	0	0	0
Color (Oscurecimiento)	Nulo (0)	Abs.	10	11	12	12
		Rel.	83	92	100	100
	Débil (1)	Abs.	2	1	0	0
		Rel.	17	8	0	0
Color (Decoloración)	Nulo (0)	Abs.	11	11	12	2
		Rel.	92	92	100	17
	Débil (1)	Abs.	1	1	0	10
		Rel.	8	8	0	83
Estructura	Nulo (0)	Abs.	10	11	11	12
		Rel.	83	92	92	100
	Débil (1)	Abs.	2	1	1	0
		Rel.	17	8	8	0
Humedad	Nulo (0)	Abs.	1	1	5	8
		Rel.	8	8	42	67
	Débil (1)	Abs.	1	3	6	3
		Rel.	8	25	50	25
	Claro (2)	Abs.	8	8	0	0
		Rel.	67	67	0	0
	Intenso (4)	Abs.	2	0	1	1
		Rel.	17	0	8	8

Abs: absoluta; Rel: relativa; T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100

Solo los valores de humedad estuvieron en niveles bajos, en ensilajes de los tratamientos 4 y 3; intermedios en 2 y altos en el 1. De esto se deduce una diferencia entre la percepción de los evaluadores y la humedad medida en el horno, ya que los datos medidos sugieren un mayor contenido de agua en los tratamientos con mayor proporción de gramínea y va disminuyendo a medida que se incrementa la proporción de (TD) en este orden: T4, T3, T2 y T1. Debe tenerse en cuenta que en si los micro-ensilajes mostraron valores de

humedad altos, aunque no se presentaron lixiviados significativos y la calidad del ensilaje no fue afectada.

Calidad organoléptica después de la prueba de estabilidad aeróbica. Todas las muestras de ensilaje se mantuvieron aeróbicamente estable durante el tiempo de prueba. En todas las muestras fueron hallados visualmente levaduras y mohos después de abrir el microsililo.

En la tabla 5-4 se aprecia que después de los 7 días de apertura, los valores de la calificación sobre dos parámetros evaluados sugieren que el ensilaje no presento modificaciones significativas en su calidad, en la medida que la presencia de hongos y levaduras que podrían alterar el procesos fermentativo no fue significativo en términos de la escala utilizada.

Tabla 5-4. ANAVAM: Prueba de Hotelling con nivel corregido por Bonferroni (Alfa = 0.05)

Tratamientos	Mohos	Levaduras	Significancia
T1	0.08±0.29	0.50±0.19	A
T2	0.00±0.00	0.21±0.72	A
T3	0.71±0.72	1.33±1.50	A
T4	0.38±0.61	0.67±1.03	A

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100

Estabilidad aeróbica

Todas las muestras se mantuvieron tratamientos aeróbicamente estable durante el tiempo de prueba de siete días. En tres muestras había encontrado levaduras y moho visualmente después de abrir los microsililos.

Variación de la temperatura

En la Figura 5-1 se observa que la temperatura del ensilaje desciende durante las primeras 24 horas y luego se incrementa a partir del tercer día del periodo de exposición aeróbica (PEA) en los cuatro tratamientos, notándose la diferencia respecto a la temperatura

ambiente en los cuatro tratamientos, pero sobresaliendo el incremento térmico del T4 alcanzado en los siete días pos apertura del silo.

Esto sugiere una mayor intensidad en la actividad microbiana en este tratamiento, derivada de un incremento del pH que hace que el ambiente se torne más propicio para la actividad de los organismos aeróbicos. La separación de medias en cada uno de estos días indica que hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), con un evidente incremento en T4.

No obstante, la diferencia entre la temperatura del ensilaje respecto al ambiente da cuenta de una estabilidad a la exposición aeróbica, dado que el incremento superior entre 3 y 5°C respecto a la temperatura ambiente, no se sostiene por más de tres días como se reporta en la literatura. Solo en T4 se observa un incremento superior a este rango en los dos primeros días de exposición aeróbica (Figura 5-2).

Figura 5-1. Temperatura ambiente y en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de *Pennisetum purpureum* en mezcla con *Tithonia diversifolia*

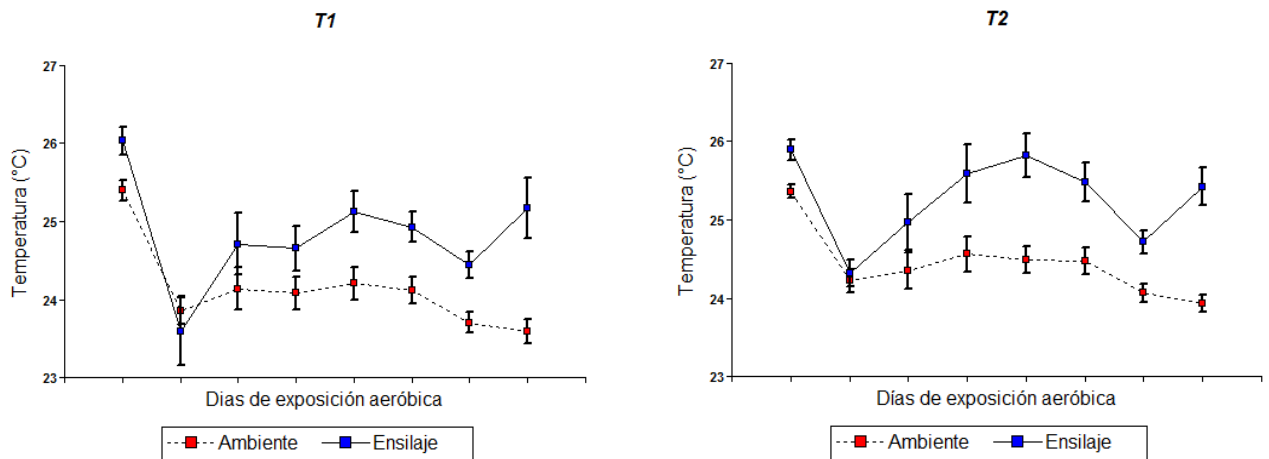
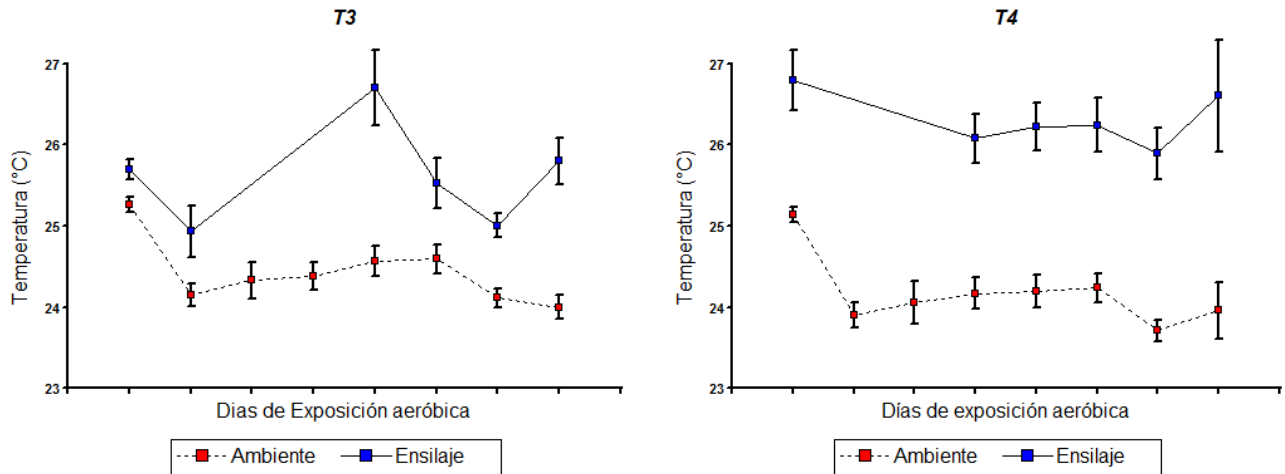
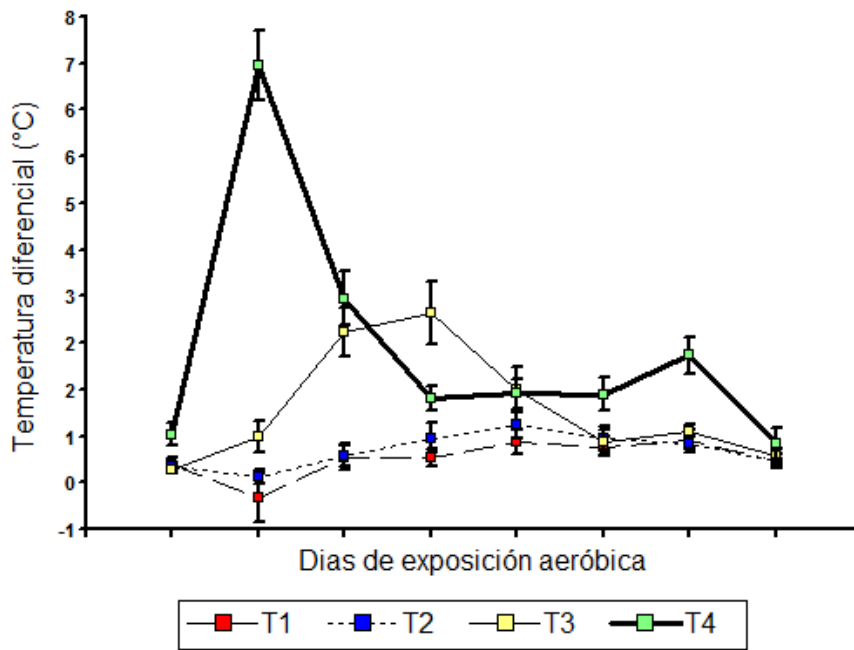


Figura 5-1 continua en la pagina siguiente



T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100

Figura 5-2. Variación térmica en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de *Pennisetum purpureum* en mezcla con *Tithonia diversifolia*



T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100

Los tratamientos que contienen una mayor proporción de *T. diversifolia* (T1 y T2) fueron los que presentaron un menor incremento de temperatura respecto al ambiente, lo cual posiblemente se derive de un ambiente ácido más estable, dada la capacidad buffer de TD, menos propicio para la actividad microbiana y por tanto una menor oxidación.

Pahlow et al. (2004) manifiestan que cuando la temperatura de ensilajes eleva persistentemente 3°C por encima de la temperatura ambiente, la muestra se considera como aeróbicamente inestable y ha comenzado a deteriorarse.

Al respecto, Mendieta-Araica et al. (2009) considera que una vez que una temperatura de la muestra de es de 5° C por encima de la habitación durante tres días consecutivos registró tres veces seguidas, la muestra se considera en mal estado.

Cambio en material seca y pH después de la prueba de estabilidad aeróbica

Los resultados de MS y el pH determinado después de la prueba de la estabilidad aeróbica se pueden leer en la Tabla 5-5.

Tabla 5-5. Variación de la MS en el periodo de exposición aérobica de ensilajes de *Penisetum purpureum* en mezcla con *Tithonia diversifolia*

Tratamiento	MS (%)		
	Apertura	Siete días	Diferencia
T1	28.39±1.06d	30.3±0.95c	1.91±0.80a
T2	25.75±1.43c	26.74±1.05b	0.99±1.65a
T3	23.45±0.89b	24.59±1.62b	1.14±1.58a
T4	18.67±0.90a	21.05±5.49a	2.38±4.90a

T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100

Se presentó un ligero incremento de la MS después de la PEA, respecto a la apertura los 90 d, posiblemente como respuesta a la pérdida de humedad sucedida en la exposición al efecto desecante del aire. Sin embargo, la diferencia en el valor de MS de los cuatro tratamientos no mostró diferencias significativas. Cabe anotar que, tanto en la apertura del ensilaje (90 días) como después de la PEA, se detectaron diferencias significativas en la prueba de medias ($p > 0.005$) entre tratamientos, con una tendencia a que los tratamientos con mayor proporción de TD presentaron una mayor proporción de MS.

El efecto desecante de la exposición aeróbica se evidencia en los valores de pérdida de peso, dado que se presentaron valores (sin diferencias estadísticas dado un P-valor de 0.1539) de 5.7 g; 30.3 g; 23.3 g y 27.7 g para los tratamientos T1, T2, T3 y T4, respectivamente, sugiriendo una baja pérdida de peso en el tratamiento que solo contenía

TD y una mayor pérdida de peso en los tratamientos que incluían PP en la mezcla, lo cual corresponde con la mayor humedad de estos tratamientos

Estos resultados constituyen un caso atípico, pues la literatura generalmente reporta pérdidas de MS y nutrientes que puede oscilar entre 1.5 y 4.5% diario (Honig & Woolford, 1980) después de la exposición a condiciones aeróbicas. Sin embargo, el estudio de Gerlacha, Roß, Weiß, Büscherb, & Südekum (2014) presenta un proceso de una ligera concentración de la materia después de la exposición a condiciones anaeróbica al pasar de 29% a 29.8% en un periodo de 8 días de exposición.

Los resultados de MS son menores a los reportados por otros autores en ensilajes de gramíneas o leguminosas: Avila, Pinto, Figueredo & Schwant, 2009, reportaron 41.8% en ensilaje de sorgo; Caraballo (2010), 30% en ensilaje de sorgo dulce enriquecido con melaza y Jones, Heinrichs, Roth, & Isher (2004) en sorgo (*Sorghum spp.*) que fueron de 28.8% MS.

A pesar de que Ashbell, Weinberg, Bolsen, Hen & Azrieli (1999) reportan que en ensilajes con menos del 30% de MS se presenta una fermentación indeseable a causa de los efluentes, los cuales crean un problema de contaminación ambiental y aumentan pérdidas, en el presente estudio los tratamientos presentaron MS menores al 30%, sin tener pérdidas significativas por lixiviados ni deteriorarse sus propiedades. Aunque, cabe anotar que estos altos niveles de humedad fueron expresados en la prueba organoléptica sensorial realizada por expertos para la variable humedad, quienes emitieron una mayor frecuencia de calificaciones altas en la escala de 0 a 4 para los microsilos del T1 y T2 y alta frecuencia de calificaciones bajas en para T3 y T4.

Es posible que a través del tiempo de fermentación se disminuyera la MS, esto debido probablemente a que el agua es uno de los productos finales de la fermentación cuando se producen procesos respiratorios al interior de un silo, tal cual sucedió en el estudio de Villalba (2013) y en el presente estudio.

Respecto al pH, en el momento de abrir los microsilos se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$) y entre inóculos ($p < 0.0001$), pero no hubo diferencias en la interacción ($p = 0.0802$). Los ensilajes inoculados con la cepa T-

735, fueron los que presentaron un menor pH (3.98), seguido de los ensilajes inoculados con SIL-ALL^{®4x4} (pH 4.05), siendo el ensilaje sin inoculo el que presentó el mayor pH (4.17), con diferencia de medias por Tukey ($p < 0.05$). Estos resultados confirman la eficiencia de la cepa T-735 como acidificadora del medio, tal como se expresó en Rostock Fermentation Test (RFT) (Capítulo 4).

Entre tratamientos, el análisis de varianza realizado para la variable pH sugiere que hubo diferencias significativas tanto en la apertura del silo, siete días después de exponerse a la fermentación aeróbica y en el cambio de pH. La diferencia de medias por Tukey ($p < 0.05$) indica diferencias estadísticas entre tratamientos. Los datos confirman que la acidificación es mayor cuando la proporción de la gramínea se incrementa en el ensilaje, tal como se sugirió en el RFT (Capítulo 4, Tabla 5-6).

Tabla 5-6. Variación del pH en el periodo de exposición aeróbica de ensilajes de *Penisetum purpureum* en mezcla con *Tithonia diversifolia*

Tratamiento	Acidez (pH)		
	Apertura	7 días	Cambio
T1	4.28 ± 0.12d	4.69 ± 0.91a	0.41 ± 0.95a
T2	4.15 ± 0.13c	5.06 ± 1.36a	0.91 ± 1.43a
T3	4.00 ± 0.07b	6.46 ± 0.89b	2.45 ± 0.88b
T4	3.83 ± 0.08a	6.64 ± 0.66b	2.81 ± 0.67b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).
 T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100.

En general, las gramíneas tienen una baja capacidad buffer dando como resultado un pH más bajo durante la etapa de fermentación aeróbica. Tal como lo menciona Heinritz, et al. (2012). Las gramíneas tropicales tienen concentraciones de CNE en un intervalo desde 31 a 77 g/kg MS, por lo tanto, la acidificación es más fácil cuando la mezcla tiene una alta proporción de gramíneas.

El aumento de la gramínea en la mezcla probablemente redujo la capacidad amortiguadora de *T. diversifolia*, lo cual explica los valores de pH más bajos en las mezclas con un mayor porcentaje de inclusión de *P. purpureum* (T3 y T4) y al contrario los ensilajes con mayor proporción de TD presentaron los mayores valores de pH (T1 y T2). No obstante, el papel de TD es notorio una vez que los silos son expuestos a la fermentación aeróbica, en la

medida que su mayor capacidad buffer tiene un mayor efecto en el cambio de pH una vez que el silo es abierto.

Así, la mayor estabilidad al efecto de la fermentación aeróbica, se da en los ensilajes con mayor proporción de TD (T1 y T2) respecto a los que tienen mayor proporción de PP (T3 y T4). Así, el pH obtenido después de siete días del PEA en comparación al momento de la apertura del silo, en los cuatro tratamientos mostraron diferencias significativas, indicando una variación estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Sólo para el T1, la diferencia no fue significativa ($p = 0.1366$).

5.4 Conclusiones

Los ensilajes fueron aeróbicamente estables cuando fueron expuestos al aire, aunque se observó presencia de microorganismos causantes de deterioro como mohos y levaduras, su presencia no fue significativa.

La variación de la temperatura en el PEA no sobrepasó los 3°C por más de tres días lo cual ratifica la estabilidad aeróbica del ensilaje

Se presentó un ligero incremento de la MS después de la PEA, posiblemente como respuesta a la pérdida de humedad sucedida en la exposición al efecto desecante del aire. Sin embargo, la diferencia en el valor de MS de los cuatro tratamientos no mostró diferencias significativas.

Es evidente el papel positivo de TD en la estabilidad aeróbica del ensilaje, *en virtud de* su mayor capacidad buffer tiene un mayor efecto en amortiguar el cambio de pH una vez que el silo es abierto. Así, la mayor estabilidad aeróbica, se da en los ensilajes con mayor proporción de TD (T1 y T2) respecto a los que tienen mayor proporción de PP (T3 y T4).

Agradecimientos

A la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima por el financiamiento parcial de este proyecto. Al CIAT por facilita el desarrollo de los experimentos requeridos para este artículo y por la siempre buena disposición del equipo de apoyo técnico del laboratorio de Calidad de Forrajes.

5.5 Referencias

- Association of Official Analytical Chemists. (200). AOAC 930.15. *Moisture in animal, loss on drying at 135 C for 2 hours*. Gaithersburg, MD, USA.
- Association of Official Analytical Chemists. (2010). AOAC 973.18. *Fiber (acid detergent) and lignin (H₂SO₄) in animal feed*. Gaithersburg, MD, USA.
- Ashbell, G., Weinberg, Z.G., Bolsen, K.K, Hen, Y. & Azrieli, A. (1999). The silage characteristics of forage sorghum mixed in different proportions at two stages of maturity. *African Journal of Range & Forage Science*, 15(1-2), 69-72.
- Avila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueredo, H.C.P. & Schwant, R.F. (2009). Effects of an indigenous and a comercial *lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. *The Journal of the British Grassland Society. Grass and Forage Science*, 64, 384-399.
- Betancourt, M. (2001). *Efecto de la melaza, ácido fórmico y tiempo de fermentación sobre la ensilabilidad de la Leucaena leucocephala*. (Trabajo de grado). Facultad de Agronomía. Luz Maracaibo, Venezuela.
- Caraballo, W. (2010). *Utilización de sorgo dulce (Sorghum saccharatum) como forraje diferido en la alimentación de cerdas gestantes*. (Trabajo de grado). Universidad de la Republica. Facultad de Agronomía. Uruguay
- Cárdenas, J., Solorio, F. & Sandoval, C. (2004). *Ensilaje de forrajes: alternativa para la alimentación de rumiantes en el trópico*. (Series manuales/UADY v. 5). Yucatán, México: Ediciones de la Universidad autónoma de Yucatán Mérida.
- Danner, H., Holzer, M., Mayjuber, E. & Braun, R. (2003). Acetic Acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1): 562-567.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Deutsche Landwirtschafts- Gesellschaft. (2004). *Grobfutterbewertung. Teil A - DLG-Schlüssel zur Bewertung von Grünfütter, Silage und Heu mit Hilfe der Sinnenprüfung*. Frankfurt.
- Fernández, A.E. (2015). *Evaluación de parámetros Energéticos-Proteicos y Productivos del Panicum máximum y P. coloratum, en diferentes estados de madurez y por efectos de defoliaciones periódicas*. (Investigación INTA-ICA). La Habana: Universidad Agraria.

- Gerlacha, K., Roß, F. Weiß, K. Büscherb, W. & Südekum, K.H. (2014). Aerobic exposure of grass silages and its impact on dry matter intake and preference by goats. *Small Ruminant Research*, 117(2-3), 131–141. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.033
- Heinritz, S., Martens, S.D., Avila, P. & Hoedtke, S. (2012). The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology*, 174(3-4), 201-210. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.017
- Honig, H. (1990). Evaluation of aerobic stability. Proceedings of the EUROBAC Conference, 12-16 August 1986, Uppsala. *Grov Foder Grass and Forage Reports, Spec. 3*, 76-82.
- Honig, H. & Woolford, M. K. (1980). Changes in silage on exposure to air. En C. Thomas (Ed.), *Forage Conservation in the 80s*. Hurley, Berkshire, UK: British Grassland Society.
- Jones, C.M., Heinrichs, A.J., Roth, G.W. & Isher, V. A. (2004). *From harvest to feed: Understanding silage management*. Pennsylvania: Pennsylvania State University. College of Agricultural Sciences.
- Mannetje, L.T. (2000). Silage making in the tropics with particular emphasis on smallholders. In *proceedings of the FAO Electronic Conference on Tropical Silage*, P1. (1 September- 15 December 1999). Roma: FAO, Rome.
- Mendieta-Araica, B. Spörndly, E. Reyes-Sánchez, N. Norell, L. & Spörndly, R. (2009). Silage quality when *Moringa oleifera* is ensiled in mixtures with Elephant grass, sugar cane and molasses. *Grass and Forage Science*, 64, 364–373
- Moore, J.E. (1970). Procedures for the two-stage in vitro digestion of for ages. In Harris, L.E. *Nutrition research techniques for domestic and wild animals, Vol. 1*. Logan: Utah State University.
- Muck, R.E. (1996) A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. *Annual Research Summaries*, 1996, 46–47. Recuperado de https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/50901500/research_summaries/1996researchsummaries.pdf
- Pahlow, G. (1991). Role of microflora in forage conservation. In PaMow, G. & Honig, H. (Eds.), *Forage conservation towards 2000*, (pp. 26-36). Braunschweig, Germany.
- Pahlow, G., Honig, H. & Martens, S.D. (2004). Simple laboratory scale techniques for monitoring and controlling the lactic acid fermentation and shelf life of feeds and foods. In Congreso; Food safety under extreme conditions. A conference on small scale production units of traditional fermented foods. Jaén, España.
- Ruser, B. & Kleinmans, J. (Julio, 2005). The effect of acetic acid on aerobic stability of silages and on intake. Trabajo presentado en *Silage production and utilisation : proceedings of the XIVth International silage conference, a satellite workshop of the XXth International Grassland congress* Belfast, Northern Ireland

- Shreve, B., Thiex, N. & Wolf, M. (2006). *National Forage Testing Association Reference Method: NFTA Method 4.1. Dry Matter by Oven Drying for 3 Hours at 105o C.* National Forage Testing Association, NFTS. Omaha, NB. Recuperado de <http://www.foragetesting.org/>
- Villalba, D.K., Holguín, V.A. & Piñeros, R. (2011). Evaluación cualitativa de calidad de ensilajes, Una experiencia de investigación en el aula. (pp. 139-148). En Mora-Delgado, J & Holguín, V.A (Eds.) *Medios de vida y materiales orgánicos en fincas campesinas*. Editorial Universidad del Tolima, Ibagué.
- Villalba, D.K. (2013). *Indicadores de calidad de ensilaje de sorgo dulce (Sorghum saccharatum) enriquecidos con aditivos de Lactobacillus buchneri y Lactobacillus plantarum.* (Tesis de Maestría). Universidad del Tolima, Ibagué.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
- Wilhelm, H. & Wurm, K. (1999): *Futterkonservierung und –qualität: silagebereitung - Heuwerbung - Getreide- und Maistrocknung.* German.

6. Inclusion level of *Tithonia diversifolia* on fermentative parameter and nutritional quality of *Pennisetum purpureum* silage enriched or not with lactic acid bacteria strains

V.A. Holguín^{1,2}, H.M. Cuchillo^{3,4}, J. Mazabel³, S. Quintero³, S.D. Martens³ and J. Mora-Delgado².

¹ National University of Colombia, Palmira. A.A 237, Palmira – Colombia; ² Research Group of Livestock Agroforestry Systems, University of Tolima, A.A. 546, Ibagué – Colombia, Email: vholquin@ut.edu.co; ³ International Center for Tropical Agriculture (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia. siriwan@gmx.net; ⁴ Animal Nutrition Department, National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubirán”, 14000 D.F, Mexico,

Email: mario.cuchilloh@incmnsz.mx

Abstract

Tithonia diversifolia (TD) has great potential for feeding ruminant and monogastric because it has a high content of protein and minerals and a good acceptance by the animals for consumption. To select the best fermentation parameters of the materials favoring the availability of nutrients for rumen microorganisms we evaluated the association of TD and *Pennisetum purpureum* (PP) for silage making and the dynamics of gas production. TD and PP were harvested, wilted, chopped and ensiling in micro-silages (1kg). It was arranged in four different proportions as treatments: T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100 (FM weight). Each micro-silage was inoculated as follows: control, lactic acid bacteria (LAB) strain T735 (identified as *Lactobacillus paracase*), SIL-ALL^{®4x4}, resulting in 12 treatments in total. *In vitro* gas production was measured at 3, 6, 12, 24, 33, 48, 60, 72, 96, 120 and 144 h in triplicate. A factorial experimental design was used with two factors. The first factor, was the inclusion level of the TD/PP and the second factor, was the inoculant used: $Y_{ij} = \mu + PP_i + I_j + I \times PP_{ij} + \epsilon$; where Y = is the target variable, μ is the overall mean; I = inoculant (control; T735; SIL-ALL^{®4x4}), PP = proportion of grass in the silage (0/100, 33/67, 67/33,

and 100/0) and ε = random experimental error. Analysis of variance was performed and statistical differences were detected by Duncan mean comparisons ($P < 0.05$). A Gompertz equation was used to model gas accumulation from different treatments. Gas accumulated at 144 hours in T1 (161.16 ml) had statistical differences ($P < 0.0001$) compared to the other treatments. An increased gas production was found in T4 (0/100; TD/PP) at 144 h (204.12 ml). The results of mixture (TD/PP) indicate that silages prepared with higher inclusion of TD, independent of LAB inoculation, produced fewer gases, ranging between 161.2 and 174.45 mL/g. meaning that larger amount of inclusion of TD in ensiling process decrease the gas production. Gompertz equation results indicate that the highest rate of gas production were: T4 and T3 with 3.34, 3.20 mL/h, respectively. Lower values (3.03 and 3.09 mL/h) were reported for the treatments with higher proportion of TD, respectively). It can be concluded that the treatments with a high percentage of TD presented the lowest values of gas production ($P < 0.0001$), while treatments with higher grass inclusion produced more gas.

Keywords Gas production, Inoculum, *Pennisetum purpureum*, Ruminant fermentation

Resumen

Tithonia diversifolia (TD) tiene un gran potencial para la alimentación de rumiantes y monogástricos, ya que tiene un alto contenido de proteínas y minerales y una buena aceptación por parte de los animales para el consumo. Se evaluó la asociación de TD y *Pennisetum purpureum* (PP) para seleccionar los mejores parámetros de la fermentación de los materiales que favorezcan la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos del rumen y cuantificar la dinámica de la producción de gas. Forraje de TD y PP se cosechó, se hizo un marchitado, picado y ensilado para preparar micro-ensilajes (1 kg). El ensilaje se dispuso en cuatro proporciones diferentes como tratamientos: T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; y T4: 0/100 (por peso en FV). Cada micro-ensilado se inoculó de la siguiente manera: control; con cepa de bacterias ácido lácticas (BAL) T735 (identificado como *Lactobacillus paracasei*); SIL-ALL^{®4x4}, lo que resultó en 12 tratamientos. La producción gas *in vitro*, se midió a las 3, 6, 12, 24, 33, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 h por triplicado. Se utilizó un diseño experimental factorial, donde el primer factor fue el nivel de inclusión de TD/PP y el segundo factor fue el inoculante utilizado: $Y_{ij} = \mu + P_i + I_j + x + \varepsilon_{PPij}$; donde Y es la variable de respuesta, μ es la media general; I = inoculante (control;

T735; SIL-ALL^{®4x4}), PP = proporción de gramínea en el ensilaje (0/100, 33/67, 67/33 y 100 / 0) y ϵ = error experimental aleatorio. Se hizo un análisis de varianza en el cual no se detectaron diferencias estadísticas por comparación de medias con una prueba de Duncan ($P < 0.05$). Una ecuación de Gompertz se utilizó para modelar la acumulación de gas de los diferentes tratamientos. El gas acumulado a las 144 horas en T1 (161.16 ml) tuvo diferencias estadísticas ($P < 0.0001$) en comparación con los otros tratamientos. Un aumento de la producción de gas se encuentra en T4 (0/100 TD/PP) a las 144 h (204.12 ml). Los resultados en la mezcla TD/PP indican que los ensilajes preparados con una mayor inclusión de TD, independiente de la inoculación (LAB), producen menos gas, el cual osciló entre 161.2 y 174.45 ml/g. lo que significa que una cantidad mayor de inclusión de TD en el ensilaje disminuye la producción de gas. Los resultados de las ecuaciones de Gompertz indican que la mayor tasa de producción de gas fueron: T4 y T3 con 3.34, 3.20 mL/h, respectivamente. Los valores más bajos (3.03 y 3.09 ml/h) fueron reportados para los tratamientos con mayor proporción de TD, respectivamente). Se puede concluir que los tratamientos con un alto porcentaje de TD presentaron los valores más bajos de producción de gas ($P < 0.0001$), mientras que los tratamientos con mayor inclusión de gramínea producen más gas.

Palabras clave: Producción de gas, Linóculo, *Pennisetum purpureum*, Fermentación ruminal, *Tithonia diversifolia*.

6.1 Introduction

The growing competence between the production of human food and animal feed resources, demands new alternatives for animal feeding that do not compromise human foods supply. There is a special interest in research for unconventional forage species which can be offered as hay or silage throughout the year, particularly in times of feed scarcity as drought seasons (González, 1994; Wattiaux, 2000). Tropical legumes and non-leguminous forbs are feasible options to increase crude protein in the diet whereas no competition to human is created (Rosales, 1999).

Tithonia diversifolia (TD) is a non leguminous specie well distributed in the humid and sub-humid America, Asia and Africa and along vicinities of the earth's tropical and subtropical

belt (Sonka, 1997; Jama et al., 2000). It has been described as a multipurpose shrub with a high protein value. Different studies reports that this plant has an high variety of compounds as water soluble substances and different quantities of fats, oils, waxes, extracts like resins, and terpenes, changing according to age, portion of the plant and provenance (Ekeocha & Fakolade, 2012; Essienn & Uriah, 2013; Lezcano et al., 2012; Zhao et al., 2012; Mahecha and Rosales, 2005). Considering that TD shows high natural distribution in tropical countries, this underutilized plant might contribute to livestock production if its foliage is conserved as silage.

Tropical regions possess climatic variations as long dry periods with marked rainy seasons which are becoming more unpredictable (Fujisaka et al., 2005; Holmann, Rivas, Argel, & Pérez, 2004). Apart from climate, low quality tropical forages constitute some of the main factors that limit the development of livestock production systems due to poor animal performance (Bernal Bechara, 2007). For such reasons, feedstuff preservation as silage can be a feasible alternative for fodder production during high availability seasons (Wattiaux, 2000; Holguín, 2005). Some legumes and non-leguminous forbs as TD, show better nutritional value than grasses, favoring an increased crude protein content, reduced fiber values and augmented digestibility (Rosales, 1999). Despite the high protein content in TD, there are few studies conducted in terms of silage making. Therefore, it is necessary to know the extent of inclusion of TD and the possible blending with grasses to obtain the maximum benefit for animal nutrition and for farmer's households.

Silage conservation depends mainly on an absence of oxygen and rapid acidification that occurs when a sufficient amount of lactic acid is produced and promoted by the population of lactic acid bacteria (*LAB*) naturally present on the plant surface at harvesting (McDonald, Henderson, & Heron, 1991). In this sense, it is important to improve lactic acidification during for a successful fermentation process. This effect can be facilitated if during the ensiling process *LAB* are inoculated. In temperate countries, selected homofermentative lactic acid bacteria have been traditionally developed to favor lactic acidification an to lower pH (Huisden, Adesogan, Kim, & Ososanya, 2009; Muck, 2004). However, strains isolated typically used for ensiling do not perform well when they are inoculated to tropical silages (Heinritz et al., 2012). Therefore, epiphytic bacteria seems to be a good alternative to increase fermentative parameters and to improve aerobic stability of tropical forages when

ensiling. In recent investigations, epiphytic LAB strains isolated from tropical forage species have been studied as promising candidates to be used as silage additives to overcome the limitations of commercial inoculants and to minimize the nutritive value losses of silage (Heinritz et al., 2012).

One of the accepted methods to evaluate animal feed is the gas production technique. *In vitro* gas production methodology determines the extension and the kinetics of feed degradation through the volume of gas released, directly as a product of the fermentation and indirectly from the neutralization of the ruminal fluid (Posada y Noguera, 2005). Thus, the anaerobic digestion of cellulose and other types of fiber, by action of ruminal microbes (e.g. *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flauifaciens*) convert major portions of carbohydrate and protein in microbial protein, volatile fatty acids, succinate, formate, lactate, ethanol, carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄), and traces of H₂ (Posada and Noguera 2005; Schofield, Pitt, & Pell, 1994; Menke and Steingass, 1988).

In this sense, it has been determined that accumulated enteric CH₄ production in ruminants is increased along the fermentation time, but it decreases the energy utilization efficiency and contributes to the global greenhouse gas effect (Leng, 2008). CH₄ is produced under anaerobic conditions by rumen microorganisms, called methanogenic archaea, that gain energy by reducing CO₂ with H₂ to form CH₄ (Leng, 2008).

CH₄ production depends primarily on quantity and quality of the diet (Beauchemin, McAllister, & McGinn, 2009; Peter J. Van Soest, 1994), thus, the mitigation of methane production from ruminants could be achieved by altering the animal diet (Singh et al., 2012). For instance, previous studies have suggested that increased fodder quality, altering the diet to more quality, will decrease CH₄ emissions per unit of weight gain (Mc Geough et al., 2010) or per unit of animal product produced as milk or meat (Moss, Jouany, & Newbold, 2000), due to improvement in animal productivity (Gemedu, Hassen, & Home, 2014). In the same line, an increased proportion of concentrate in ruminant diets is generally associated with a reduction in CH₄ emission (Lovett et al., 2003), but, in the tropical livestock production systems, it is not feasible to provide feed rations based on concentrates, because diet

ingredients would represent an income reduction for farmers. Therefore, it is important to advance in the research on tropical forages to design sustainable food strategies.

The mitigation process of methane has been modeled by equations to describe and interpret cumulative gas production profiles (France, Dijkstra, Dhanoa, Lopez, & Bannink, 2000; Schofield et al., 1994) suggested Gompertz and logistic mathematical models to describe gas production and compared these with exponential and simple Mitscherlich models; in our study the first equations was used.

The aim of this study was to evaluate the effect of four different inclusion levels of *Pennisetum purpureum* (0, 33, 67 and 100%) in silages based on *Tithonia diversifolia* (TD), as well as the enrichment or not with LAB strains (T-735 and SIL-ALL^{®4x4}) on the fermentation parameters (NH₃-N and CH₄), nutritional quality (DM, CP, NDF, ADF and ash) and *in vitro* gas production and degradability of DM of silage.

6.2 Material and Methods

6.2.1 Plant Material

Samples of TD forage was harvested (10 cm above-ground biomass including leaves and stems) at pre-flowering stage in February 2013 on the experimental farm from the Universidad Nacional de Colombia, Palmira (1.000 masl, 24°C, annual precipitation 1020 mm and relative humidity 72%), PP was harvested at vegetative state (10 cm above ground level) at the same time and location. After that, they were chop using a mincing machine grass to a particle size from two to three cm.

6.2.2 Silage Preparation

Forage material of TD and PP showed adequate humidity levels entre 30 and 35% (Ashbell & Weinberg, 2001) contents before ensiling. Four repetitions of each silage treatment were prepared. The mixtures of different treatments were made as follows: control (without inoculum); lactic acid bacteria (LAB) strain T735; SIL-ALL^{®4x4}. The TD and PP were arranged in four different proportions [T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100, fresh matter (FM) basis], resulting in 12 treatments in total. Half of each treatment was inoculated with the respective strain. SIL-ALL^{®4x4} is a commercial inoculum blend of lactic acid-

fermenting bacteria (BLB) based on *Streptococcus faecium* (CNCM I-3236), *L. plantarum* (CNCM I-3235), *Pediococcus acidilactici* (CNCM I-3237) and *L. salivarius* (CNCM I-3238) and T735 is an ephiphitic strain of *Lactobacillus paracasei*. Both were applied at a rate of 108 cfu / 0.1 ml.kg-1 in a Ringer-solution. The bacterial inoculum was prepared soluble in small spray bottles for spraying 1 ml per kg fresh forage. The mixtures were packed in vacuum bags 1 kg and were stored for 90 days in darkness at room temperature.

The microsilos were prepared following the methodology of Hoedtke & Zeyner (2011). To this, 600 grams of the mixture of chopped forage is packed with particle size of about 1 cm, in plastic bags gauge 8 "x 12" (20.3 cm x30.5 cm). These previously were inoculated with the respective strain at a rate of 10 8 cfu / 0.1 ml per kg in Ringer solution. Bags were hermetically sealed under vacuum. A packaging mark "vacum sealer PRO 2300" was used. They were stored in a dark room at an ambient temperature of about 25°C.

At day 90, they were opened, lyophilized and ground in a Thomas Wiley Mill Laboratory Mill rotor Model 4 with a 1.0 mm mesh screen to perform the test gas. Thus, four treatments were analyzed, with four replications, for a total of 48 micro-silos vacuum packed

Further, a Westonbrand Vacuum Sealer PRO 2300 Stainless Steel was used to evacuate air and seal the bag. They were wrapped with package tape to assure the bag being in a stable shape and avoid density getting lower by gas production during the fermentation process. With a disinfected, small needle the bag was punctured to let these gases escape out of the bag so that it would not expand. Each bag was brought into a second bag and air was evacuated and the bag heat-sealed. Two additional replicates of samples (~250 g) were filled in smaller bags to be opened after three days of ensiling at 25°C storage temperature for the determination of DM and pH. The micro-silages were stored to be evaluated after 90 days of fermentation at 25°C storage temperature. We proceeded to the opening of micro silage, which were freeze-dried and ground to a particle size of 1mm, according to (Hoedtke & Zeyner, 2011).

6.2.3 Nutritive Value

Samples of silage were analyzed at the Laboratory Quality Forages of CIAT. Analysis of dry matter (DM) were made in forced air oven at 63°C until constant weight (72 h); crude protein (CP) by the Kjeldahl method; insoluble fiber in neutral and acid detergent (NDF and ADF) following the sequence described by (Van Soest, P.J; Robertson, & Lewis, 1991) and ether extract (EE) by extraction soxhelet. The ash content was determined by direct incineration a muffle furnace at 500°C, according to AOAC (2005), which were dried in an oven with forced ventilation at a temperature of 65°C for 72 h.

6.2.4 *In Vitro* Gas Production

The fresh forage was subjected to a drying process in a conventional oven at a temperature of 60°C for 72 hours. It were then processed in a mill Thomas Wiley Laboratory Mill Model 4 with a 1.0 mm mesh sieve. The ruminal fluid was obtained from two young cannulated bulls of the Brahman breed with a diet of *Cynodon plestotachyus* (star grass) and mineralized salt ad libitum.

Cattle donors did not have access to food an hour before starting the collection of ruminal fluid. Collection of ruminal sample was done manually, this in turn was squeezed to extract the solid rumen contents and stored in thermos 2.0 L, preserved with hot water at 39°C for transport to the laboratory for a period of about 10 minutes. Ruminal liquid was filtered through four layers of gauze, to ensure a population of rumen microorganisms adhered to the fiber. Then the ruminal fluid was liquefied for 20 seconds, and filtered again before being transferred to the Erlenmeyer flasks. The ruminal liquor was then saturated with CO₂.

Following Theodorou, Williams, Dhanoa, McAllan, & France (1994), the digestion media composed of a mixture of 1244 ml of distilled water, 2.6 g of pancreatic casein, 1.3 ml of trace mineral solution, 2618 ml buffer solution, 2618 ml macromineral solution and 13.1 ml of resazurin solution (0.1%), was prepared. A stream of oxygen-free CO₂ was bubbled through the medium before adding the flask. The buffer solution containing 4 g of NH₄HCO₃ and 35 g NaHCO₃ in 1 liter of distilled water. The macro-mineral solution contained 9.45 g Na₂HPO₄ • 12H₂O, 6.2 g and 0.6 g of KH₂PO₄ MgSO₄ • 7H₂O in 1 L of distilled water. The micro-mineral solution contained CaCl₂ • 2H₂O 13.2 g, 10.0g • 4H₂O MnCl₂, CoCl₂ • 6H₂O 1 g and FeCl₃ • 6H₂O 8 g in 100 ml of distilled water.

Incubation was performed in flasks with a capacity of 160 ml. To this, 1 gram of sample (dried, ground) was weighed and 85 ml of digestion media gassed with CO₂ were added. 4 ml of reducing agent were added (was prepared at the time of use by mixing cysteine-HCl (625 mg), 1M NaOH (4 ml) and Na₂S • 9H₂O (625 mg) in 100 ml distilled water); the caps of rubber were placed and secured with metal seals.

Finally, the bottles were cooled to 4°C in the refrigerator for 24 hours. After this period, the bottles were removed from the refrigerator, and placed into a water bath at 39°C. When the incubation system was in temperature equilibrium, inoculation to each bottle was done, using 10 ml of ruminal liquor. Along with the samples, six bottles containing only the "means of digestion" were inoculated. These were considered "blank", which were used to correct gas production caused by the inoculum fermentation and the medium. For this procedure a digital meter range (Sper Scientific) and a pressure transducer (29 psi; pounds per square inch) connected to a three-way valve were used. The first way was connected to a 22G 1 needle "(25 x 0.7mm); the second, the transducer, and the third to a 60 ml syringe. The latter allowed the measurement of volume.

Before starting the process of incubation and fermentation proceeded to leave all bottles at zero psi, removing any volume produced in each top of each bottle. Volume and pressure measurements were performed at 3, 6, 9, 12, 24, 33, 48, 60, 72, 96, 120 and 144 hours. After each reading the bottles they were shaken and incubated again at 39°C in a water bath.

At the end of this incubation period the contents of each bottle was filtered on Gooch crucibles. Then, it dried at 104°C oven, of overnight. Degraded dry matter was calculated as the difference between the sample weight at the beginning of incubation and the weight of the residue of the crucible at the end of incubation. Similarly samples were taken to analyze the concentration of ammonium and protein.

Methane release

The CH₄ concentration in the gas produced was analyzed in a chromatograph (GC-2014 model, Shimadzu) Shimadzu column; 4mH-D 80 / 100,07m S-Q and 1.5 P-N. 80C column

temperature. Temperature detector (FID) was 250°C. Direct injector temperature was handled at room temperature and the carrier gas utilized was nitrogen and column flow: 30.83 ml/min. The injection volume was handled by a loop with a capacity of 2 ml.

Regression model

A Gompertz equation was used to model gas accumulation from different mixtures used in the silages, where the parameters a , b and c , were estimated by analyzing nonlinear regression (Eq.1), using the software Infostat.

$$y = a \cdot \exp(-\exp(b - c \cdot T)) \quad (\text{Eq. 1})$$

Where, "y" is equal to the cumulative production of gas at time x, " a " > 0 is the maximum gas production; the parameter " b " > 0 is the difference between the initial gas and the gas at a time x, and the parameter c > 0 describes the specific rate of gas accumulation.

The practical application of this model requires the conversion of the parameters α , β , γ in its biological significance. For the purposes of this study, they are: time to point of inflection (HPI, hours), gas inflection point (GPI ml), maximum gas production rate (TMPG, ml/h) and Lag phase (FL or microbial accommodation h). To estimate the following formulas are used: $HPI = b / c$; $GPI = a / e$; $TMPG = (a \cdot c) / e$; $FL = ((b/c) - (1/c))$; where "e" is Euler's number, equivalent to ≈ 2.718281828459 .

6.2.5 Statistics Design

We used a factorial design experiment, where the first factor was the inclusion level of the Pennisetum purpureum (PP) in the silages, and the second factor was the inoculant used: $Y_{ij} = \mu + PP_i + I_j + I \times PP_{ij} + \varepsilon$; where Y = is the target variable, μ is the overall mean; I = inoculant (control; T735; SIL-ALL^{®4x4}; PP = proportion of grass in the silage (0/100, 33/67, 67/33, and 100/0) and ε = random experimental error. Analysis of variance was performed and statistical differences were detected by Duncan mean comparisons ($P < 0.05$).

6.3 Results

6.3.1 Nutritive Value

As seen in Chapter 5, percentage of dry matter decreases with increasing the proportion of the grass. This can be explained by the high content of stems that were used in the preparation of forage microsilos showing in your order $1.06d \pm 28.39$; $1.43c \pm 25.75$; $0.89b \pm 23.45$ and $18.67 \pm 0.90a$ for T1, T2, T3 and T4, respectively treatments.

As the level of inclusion of PP increases in silage based on TD, lower levels of protein, statistically significant ($p < 0.05$), were obtained. Thus, the CP values were higher in silages containing TD 100%. It should be noted that at this level of inclusion the addition of inoculum did not present any favorable effect, as silage control (without inoculum) had the highest values of CP ($p = 0.0040$). A similar pattern of CP values was observed when the inclusion level of TD /PP (67/33).

They are followed by treatments that have a proportion of 33% of TD, which showed CP levels among 8.43 to 9.01, with no significant differences under the different strains. Silage prepared with 100% PP, had the lowest levels of CP with significant differences from the other levels of inclusion, but without differences for the addition of inoculum.

In contrast, fibers (NDF and ADF) have an opposite response. It is also clear that the level of fiber (NDF) was higher in T4 ($p < 0.0001$) with significant differences from other treatments, T1 being silage in which this parameter was significantly lower. As the TD inclusion level increases, the percentage of cell wall (DNF) is reduced. No interaction effect between the two factors, both (FDN) ($p=0.0599$) and for the ADF ($p=0.0556$) was presented. Data denote a statistically significant positive effect of inocula (T735 and SilAll) on the fiber, since in inoculated silage fiber percentage is lower ($p < 0.05$).

The data show that with some level of inclusion of TD significantly improves IVDMD ($p < 0.0001$), compared to silage with PP at 100% (T4). Moreover, inoculation with strain T735 inoculation resulted in better digestibility compared to uninoculated silage, but similar to

silage SilAll ($p=0.0060$). The positive effect of the interaction is confirmed in the treatment 100/0 + T735, which resulted in the best IVDMD ($p < 0.0001$).

Ashes showed significant differences between treatment ($p=0.0047$), but no statistically significant effect of inocula ($p=0.3563$) was observed. We found an interaction between treatment * inocula ($p= 0.0008$). T1 without inoculum showed highest ash content and T2 with Silall the lowest. However, a clear trend ash content is not observed due to the level of inclusion of TD.

The NH₃-N content of silage markedly increased with increased levels of TD related to higher protein content. The addition of inoculum in all inclusion levels resulted in silage with lower NH₃-N content, which suggests a positive effect of inoculum on proteolysis reduction, possibly, related to the acidifier action of LAB (Table 6-1)

Tabla 6-1. Nutritive value of *T. Diversifolia* and *P. purpureum* silage mixture

Treatments	Inocula	ADM (%)	PC (%)	NDF (%)	ADF (%)	IVDMD (%)	ASH	N-NH ₃
T1	T735	88.1 ab	16.8 de	34.9 a	23.1 a	68.9 e	13.2 abc	0.1 ab
	Silall	88.3 abc	15.9 d	34.7 a	24.4 a	68.8 e	13.3 abc	0.2 bc
	-	88.9 bcd	18.1 e	38.6 b	28.1 b	63.9 abc	14.1 c	0.4 e
T2	T735	87.9 ab	12.7 c	40.8 bc	28.3 b	68.4 de	13.2 abc	0.1 ab
	Silall	87.2 a	12.3 c	41.7 bc	28.7 b	66.6 cde	12.9 a	0.2 cd
	-	87.8 ab	15.1 d	43.3 c	29.9 b	66.7 cde	13.6 abc	0.2 d
T3	T735	88.5 abcd	8.6 b	49.1 d	33.4 c	65.8 cd	13.9 bc	0.1 a
	Silall	89.1 bcd	9.0 b	49.3 d	33.9 c	67.1 de	13.6 abc	0.1 abc
	-	88.4 abc	8.4 b	48.8 d	34.4 c	67.4 de	13.1 ab	0.2 bc
T4	T735	89.9 de	5.3 a	57.3 e	38.2 d	63.9 abc	13.7 bc	0.1 a
	Silall	89.8 cde	5.1 a	57.9 e	38.3 d	62.9 a	13.9 bc	0.1 a
	-	90.6 e	5.1a	57.9 e	39.1 d	63.8 ab	13.7 abc	0.1 ab

TD and PP were arranged in four different proportions [T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100, fresh matter (FM) base].

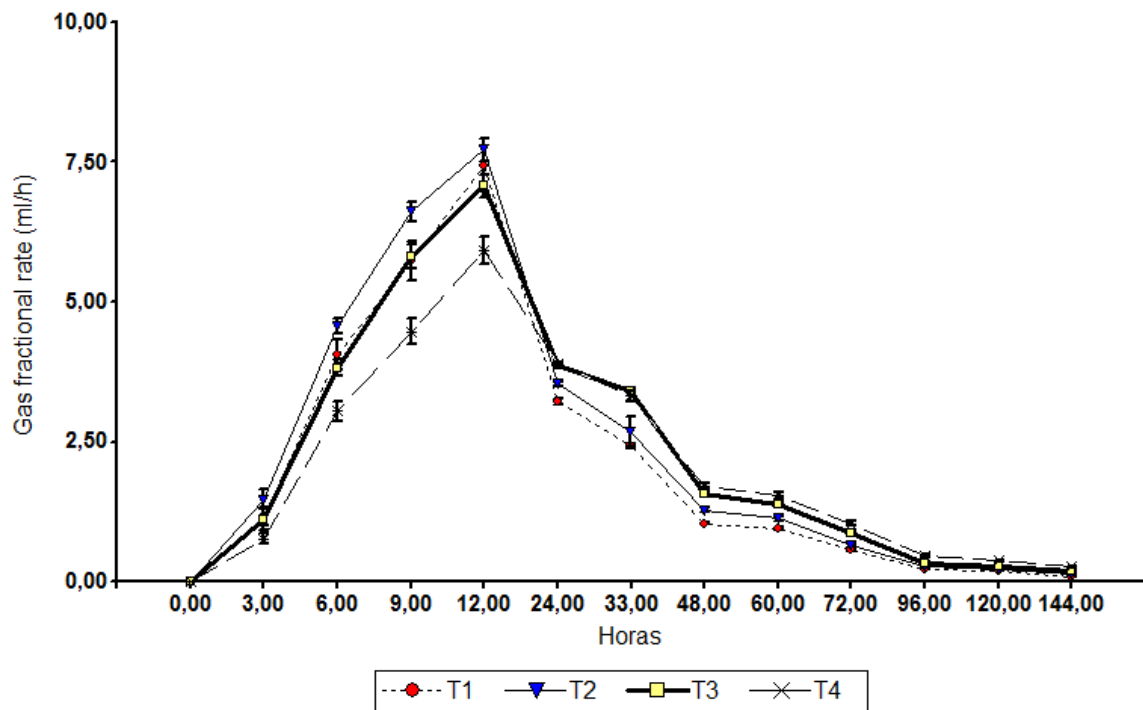
6.3.2 Gas Production

In different treatments, the maximum rates fractionated gas (mL/h⁻¹) of the ensiled mixtures are between 9 and 12 h, being the ensiled mixture (T2) which produced the highest gas at 12 h (7.72 mL/h), although no significant differences in T1 and T3, but with differences when comparing to T4.

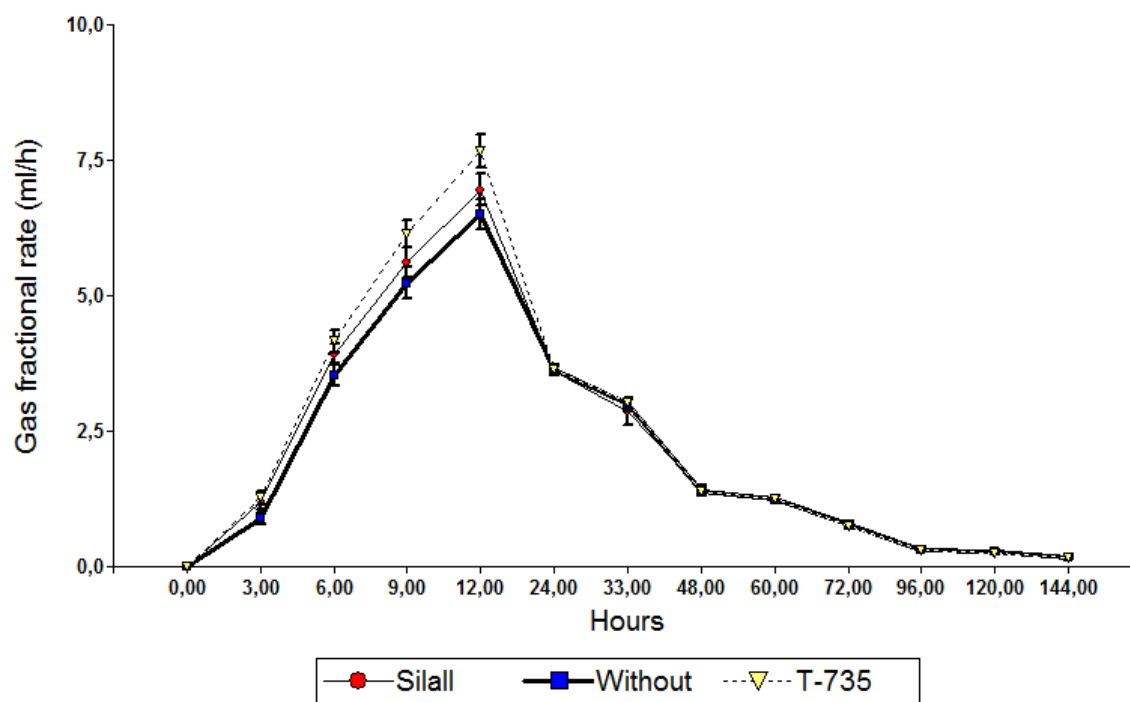
Gas production 12 hours later, was significantly reduced from the previous peak, with gas production ranged between 3.9 and 3.2 mL/h, which means a drop of 50%. In silage at 12 h post-inoculation, maximum accumulation of gas was to T-735 (7.66 mL/h) and the lowest, with significant differences with respect to the silage without inoculum (6.51 mL/h), but no statistical difference compared to silages ensiled with SilAll (6.95 mL/h).

Figure 6-1 show gas production (mL/h) for different mixtures (TD/PP) silage and Figure 6-2 represents the involvement of inoculum in the fermentation process. As you can see in Figure 6-1, in the early hours of fermentation, the largest gas production (mL) per hour effect of different treatments and inocula shown. This possibly reflects a portion of the substrate; especially soluble sugars are fermented immediately.

Figura 6-1. Fractional gas production rate per hour incubated *T. diversifolia* and *P. purpureum* mixture silages



[T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100, fresh matter (FM) base].

Figura 6-2. Fractional gas production rate per hour inoculum incubated with silage without inoculant LAB

[T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100, fresh matter (FM) base].

Cumulative gas production

The behavior of the cumulative gas production was characterized by an increase in the exposure time of the samples to attack by microorganisms. The results showed lower gas production accumulated at 144 h in T1 (161.2 mL) with statistical differences ($P < 0.0001$) compared to the other treatments. An increased gas production was found in T4 (0/100; TD /PP) at 144 h (204.12 mL). There was no effect of the inoculum in the production of gas ($P = 0.28$). The results of the interaction mixture (TD/PP) \times inoculum indicate that silages prepared with higher inclusion of TD independent of LAB inoculation produced fewer gas, ranging between 146.9 and 169.7 mL (Table 6-2), meaning that larger amount of inclusion of PP in ensiling process increase gas production. In the present study, a higher silage digestibility can be expected with higher proportion of PP, at the expense of TD.

Tabla 6-2. Cumulative gas production of *T. diversifolia* (TD) and *P. purpureum* (PP) mixture silages per gram of incubated organic matter

Treatments	Inocula	Fermentation (hours)							
		3	12	24	48	60	96	120	144
T1	-	3.17a	39.1a	80.0a	116.5a	128.0a	140.1a	144.7a	166.2a
	T735	3.5abcd	64.8ef	101.7cde	138.1bc	149.2b	160.4b	164.8b	166.9ab
	Silall	5.0bcd	60.8def	101.2cde	140.0bc	151.2b	163.6b	167.9b	169.7bc
T2	-	2.0a	52.2cd	91.1abcd	135.1b	149.1b	162.4b	167.9b	170.4bc
	T735	5.1cd	65.2f	107.6e	152.0bc	165.3bc	179.1bcd	184.1bcd	187.1cde
	Silall	5.6d	64.3ef	106.7e	144.5bc	156.8bc	169.8bc	174.6bc	177.7bcd
T3	-	3.1abcd	55.7cde	102.6de	155.6c	171.6c	189.6d	195.4d	199.6e
	T735	4.0abcd	56.2cdef	101.9cde	155.5c	171.9b	189.3d	195.7d	200.2e
	Silall	2.7abc	51.3bc	97.5bcde	151.4bc	167.3bc	185.2cd	191.2cd	195.2de
T4	-	1.7a	37.8a	84.0a	142.2bc	161.6bc	186.7cd	196.2d	202.7e
	T735	2.2ab	42.8ab	90.5abc	146.4bc	165.6bc	189.2cd	198.2d	204.8e
	Silall	2.1a	40.8a	88.0ab	145.0bc	163.7bc	188.8cd	198.1d	204.7e

T1: 100/0; T2: 67/33; T3: 33/67; and T4: 0/100 TD / PP; Different letters in the same column mean significant differences between treatments (P<0.05)

Gompertz equation results indicate that the highest rate of gas production (β parameter) were: T4+Silall; T4+T735 and T4 without inoculum with 3.31, 3.30 and 3.39 mL/h, respectively. Importantly, these treatments are those with the largest proportion of PP. Lower values (2.93, 2.98, 3.04 mL/h) were reported for the treatments with higher proportion of TD (T2+SilAll; T2+T735 and T1+T735, respectively).

By analyzing the curves of the acumulation gas of Gompertz model (Figure 6-3 and Table 6-3), it was found that the α parameter, which corresponds to the maximum gas production was higher in the T4 where the proportion of grass is greater (P <0.05, Table 6-2). Ensiled mixtures showed increases in the cumulative production of gas per gram of dry matter over time. The same happened with the GPI parameter, where T4 (PP 100%) showed higher values than the other treatments (P <0.05). The maximum time the inflection point (HPI) was T4, about 64 h; showed the same trend microbial colonization time (FL; 44.79), with a statistically significant delay relative to the other treatments.

Figura 6-3. Predicted cumulative gas production of *T. diversifolia* TD and *P. purpureum* (PP) mixture silages per gram of incubated organic matter

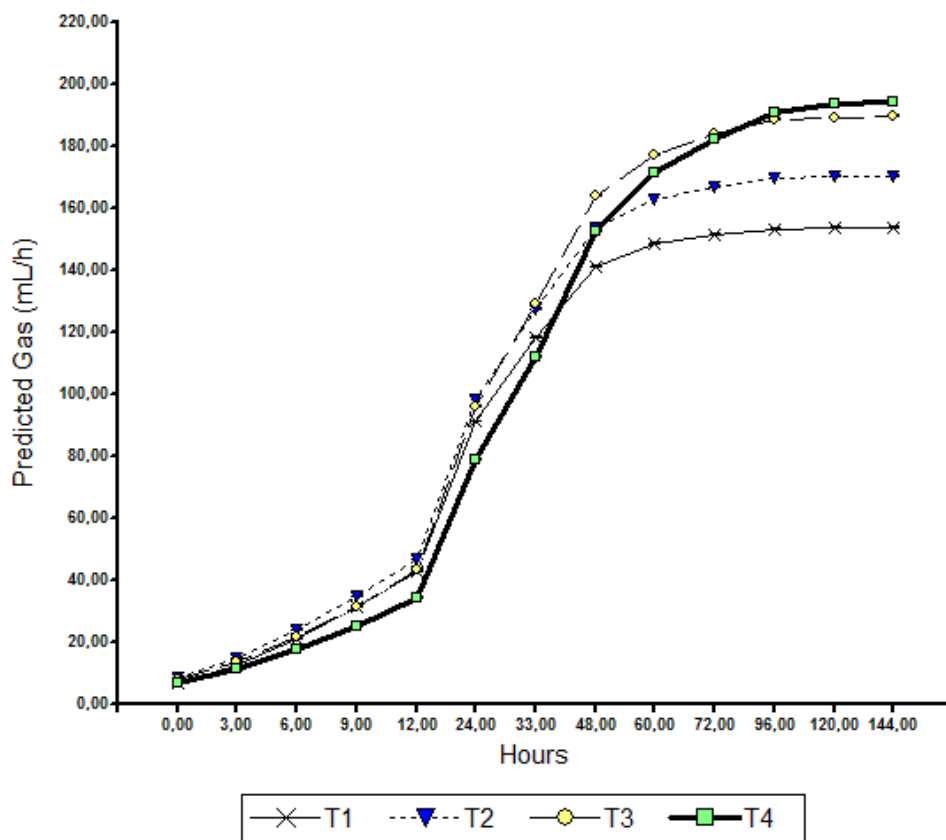


Tabla 6-3. Parameter Gompertz model for the production of gas observed at different levels of inclusion of *T. diversifolia* in *P. purpureum* silage

Inclusion	α	β	γ	HPI, h	GPI, mL	TMPG, mL/h	FL, h
T4: 0/100	194.45a	3.34a	0.05d	63.96a	71.53a	3.76b	44.79a
T3: 33/67	189.65a	3.2b	0.06c	51.36b	69.77a	4.36 ^a	35.29b
T2: 67/33	170.11b	3.03c	0.07b	42.35c	62.58b	4.48 ^a	28.36c
T1: 100/0	160.2c	3.09c	0.08a	39.08c	58.93c	4.67 ^a	26.43c

6.3.3 Methane Release

Analyses of the net production of CH₄ were made to the gas generated at 72 h incubation of 1 g of silage (Table 6-4). DM degradation ranged between 63.7 and 64.4%. It should be remembered that at 60 h after start of incubation and close to the inflection point, approximately 80-88% (table 6-2) of the total gas produced during the experiment was obtained. In all treatments methane production will differ significantly (P = 0.0003), the T1

was the treatment less methane issued regarding T2, T3 and T4, but no significant differences among the latter three.

Tabla 6-4. Methane production per gram of dry matter silage incubated at different levels of inclusion of TD /PP

Treatments	CH ₄ (mg/mL)	DDM (%)	CH ₄ (mg/g de DDM)
T1: 100/0	49.36 ± 9.2b	63.69	77.50
T2: 67/33	55.93±5.2ab	65.51	85.38
T3: 33/67	62.09±11.05a	67.07	92.57
T4: 0/100	64.06±9.7a	64.42	99.44

DDM: Degraded Dry Matter

6.4 Discussion

The productive performance of ruminants is based on the nutritional value of the diet. Methods *in vivo*, *in situ* and *in vitro* (Posada & Noguera, 2005) can make the evaluation of feed. However it can show variations in its acceptability when it is supplied fresh to ruminants, because its chemical composition can vary.

PC content in treatments with higher proportion of TD (T1 and T2) was almost three times higher than T4 (only PP). Mainly silage prepared only with TD (without inoculum) is the one with the higher PC (18%), which are double and triple, respectively, of the silage protein obtained in 30 and 90 days, reported by Roa, Castillo, & Téllez (2010), which only reached 8% and 6%, respectively. However, the protein content of T3 is not negligible (with and without inoculum), if one considers that is significantly higher than grass silage, represented in the T4, and this would be a protein content frequently found in forages tropical. On the contrary, silage with the highest proportion of TD has the greatest protein content, constituting a good option as a supplement. However, It cannot be ruled out the mixtures based on PP with 33% of TD, which could be used as a basal diet in ruminants, maintaining adequate protein: energy ratio.

Barahona & Pinzón (2005) suggest that the content of DNF in forages, where the proportion of fiber ranged between 30 and 80%, affect the productivity of the animals as well as the

voluntary intake decrease. However, fiber fractions content (NDF and ADF) of the present study were much lower those reported by Roa et al. (2010). FDN of silage TD (100%) was lower (66.2%) after 90 days of fermentation, whereas FDA represented 80% of value reported by the same authors. FDN for PP silage (T4) were much lower than those reported by others authors after 90 days of fermentation, ranging between 63.15 and 68.2 (Gutiérrez et al., 2015; Yokota, Kim, Okajima, & Ohshima, 1992). Our ADF values were lower than reported by Yocota et al.(1992) (41.6%), but very similars to Pinto-Ruiz, et al. (2010) values near to 27.8%.

This is closely associated with the consumption of MS, as well, the higher the fiber content, the higher the retention time in the rumen, thereby decreasing the voluntary intake of forage. It should be noted that the NDF obtained in silages T1 (100% TD) was 16 points lower than those reported by Roa et al. (2010) of 54.5%, and it was reduced by 4% with the addition of inocula (T735 and SIL-ALL^{®4x4}). The ADF was 3% lower than that reported by the same authors of 32% in 90 days silage.

As expected, the contents of NDF and ADF increased as the the proportion of grass in mixtures increased (TD/PP), but it is clear that an inclusion level of TD of at least 33% provides a feed with an acceptable level of these fibers for rumen functioning. ADF percentages above 65% indicate low nutritional value (Vargas, 2002). According to classification in the food quality assigned by American Forage and Grassland Council (Cóser, Cruz Fiho, Martins, & Freitas, 1993), the 33/67 mixture is nutritionally classified as "second feed of" and according Vargas (2002) corresponds to a value nutritious between high and medium quality. This is reflected in a lower IVDMD of silages, which contain higher proportions of ADF, that is, as it increases ADF, the IVDMD is waning. The percentages of ash obtained in this study are similar to those reported by (Roa et al., 2010) in TD silage at 90 days of fermentation. The growth of proteolytic microbes, which degrade protein and amino acids to NH₃, is depressed by low pH (Bureenok, Namihira, Mizumachi, Kawamoto, & Nakada, 2006)

In the process of advance of the fermentation, the hydrated material is colonized by rumen microorganisms causing different degradation rates depending on the concentration of structural carbohydrates.

Larger amount of inclusion of TD in ensiling process increase gas production. In the present study, a higher silage digestibility can be expected with higher proportion of TD, at the expense of PP. La O et al. (2009) explains that these high values in gas production in silage with the highest proportion of TD may be due to the concentration of carbohydrates and nutrients easily fermentable. Moreover, an optimization of microbial fermentation occurs in the presence of this protein fodder in the incubation medium. This because rumen microorganisms and enzymes, first attack fermentable carbohydrates and then, with the colonization of the fiber and its degradation, gas production increases (Dhanao et al., 2000; Fondevila & Barrios, 2001).

Gas production 12 hours later, was significantly reduced from the previous peak, with gas production ranged between 3.9 and 3.2 mL/h which means a drop of 50%. In silage (Figure 6-2) at 12 h post-inoculation, maximum accumulation of gas was to T-735 (7.66 mL/h) and the lowest, with significant differences respect to the silage without inoculum (6.51 mL/h), but no statistical difference compared to silages ensiled with SIL-ALL^{®4x4} (6.95 mL/h). It is evident that in the early hours of fermentation, a portion of the substrate containing soluble sugars are fermented immediately. However, soluble sugars generally represents only a small part of the potentially digestible materials (Stefanon, Pell, & Schofield, 1996). In order to fermentative process progresses, the material is hydrated and colonized by ruminal microorganisms, which originates different degradation rates depending on the concentration of structural carbohydrates (Molina Botero, Cantet, Montoya, Correa Londoño, & Barahona Rosales, 2013).

In the process of advance of the fermentation, rumen microorganisms causing different degradation rates depending on the concentration of structural carbohydrates colonize the hydrated material.

In our derivation of the Gompertz equations, an increasing with time was observed. France et al. (2000) suggest that this increasing can be interpreted as an increase in microbial activity per unit feed, but it does not involve any assumptions on the constancy of the microbial growth yield. Possibly, related to the higher amount of cell wall of the silage, after the inflection point, the rate of substrate degradation is reduced, further reducing the

fractional growth rate and consequently reducing microbial yield (France et al., 2000). In the parameter TMPG (maximum gas production rate) no significant differences between T1, T2 and T3 (including TD) was observed, but the differences were significant between these regarding T4 (without TD), possibly related to the higher digestibility of the proteinaceous material represented in TD.

It is important to notice that microbial growth yield will vary with such factors as microbial population, pH, and availability of N substrates (Dijkstra & France, 1996), It is clear that these factors could change over the incubation period (France et al., 2000). This indicates that single grass silage feed, methane production is high but may diminish as the inclusion of TD increases. This is consistent with data reported by La O et al. (2009), who in fresh fodder mixtures TD/PP found descending methane production (33.3; 30.1 and 28.06 mL) as including TD increases by 15, 30 and 100%, respectively. Clearly, the values obtained in this study were higher than those obtained by the authors cited.

The difference in methane production from a diet of grass and shrub species protein could be partly due to the presence of condensed tannins (CT) since it has been reported that the presence of these in woody fodder reduces emissions of methane (Kamalak et al., 2004). In this sense, forage of TD, although mild levels, contains between 1.0 and 1.4% TC-total (Lezcano et al., 2012; Ogundare, 2007), mainly in low rainfall and rainy seasons (Verdecia et al., 2011).

6.5 Conclusions

In treatments containing a higher proportion of TD, higher crude protein content and lower contents of NDF they were found, the same for FDA and ashes. In general, these changes in content nutrients are considered advantages of inclusion of a plant protein. Thus, as the inclusion of TD in TD/PP mixtures was increased, an increase *in vitro* digestibility of dry matter was observed.

In all treatments increased production of methane during the first 12 h of incubation. The treatments with a high proportion T. *diversifolia* presented the lowest values of gas production, while treatments with higher grass inclusion produced more gas. The silage inoculum did not influence the *in vitro* gas production.

It is recommended further experiments, both *in vitro* and *in vivo* experiments, to confirm optimal inclusion levels of grass to improve animal production without increasing emissions of methane. In this paper, methane emissions were shown to be related to the nutritional quality of the food. It is recommended *in vivo* experiments to link methane emission and the animal productivity aimed to mitigate methane releases while increasing animal performance.

6.6 References

- Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official Method 942.05. Determination of Ash in Animal Feed. In Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th edition (Chapter 4). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International. p. 8.
- Ashbell, G., & Weinberg, Z. . (2001). *Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos* (Estudio FAO producción y protección vegetal No. 161). Roma.
- Barahona Rosales, R., & Sánchez Pinzón, S. (2005). Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 69–82. http://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num1_art:39
- Beauchemin, K. A., McAllister, T. A., & McGinn, S. M. (2009). Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(35), 1–18. <http://doi.org/10.1079/PAVSNR20094035>
- Bernal Bechara, L. C. (2007). Efecto de las mezclas de las leguminosas Calliandra calothyrsus, Flemingia macrophylla, Cratylia argentea y Vigna unguiculata ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y producción de leche en bovinos. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. Recuperado a partir de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/66186>
- Bureenok, S., Namihira, T., Mizumachi, S., Kawamoto, Y., & Nakada, T. (2006). The effect of epiphytic lactic acid bacteria with or without different byproduct from defatted rice bran and green tea waste on napiergrass (*Pennisetum purpureum* Shumach) silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1073–1077. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2458>
- Cóser, A. C., Cruz Fiho, A. B., Martins, C. E., & Freitas, V. P. (1993). Modificação da composição botânica em pastagens de capim-gordura e panucun, sob pastejo. *Pasturas tropicales*, 15(2), 9–12. Recuperado a partir de <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/pages/view/Pasturas>

- Dhanao, M. S., Lopez, S., Dijkstra, J., Davies, D. R., Sanderson, R., Williams, B. A., ... France, J. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: comparison of models. *The British Journal of Nutrition*, 83(2), 131–42. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10743492>
- Dijkstra, J., & France, J. (1996). A comparative evaluation of models of whole rumen function. *Annales de Zootechnie*, 45(Suppl. 1), 175–192. <http://doi.org/10.1051/animres:19960638>
- Ekeocha, A. H., & Fakolade, P. O. (2012). Effect of graded levels of Mexican sunflower leaf (*Tithonia diversifolia* Hemsl. A. Gray) meal on the feed intake of ewe during the entire gestation period of 150 days. *Scientific Journal of Animal Science*, 1(3), 107–118. <http://doi.org/10.14196/SJAS.V1I3.144>
- Essiett, U., & Uriah, N. (2013). Comparative Phytochemical and Physicochemical Properties of *Aspilia africana* and *Tithonia diversifolia* Leaves. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 3(3), 113–122. Recuperado a partir de <http://www.modernscientificpress.com/Journals/ViewArticle.aspx?oNi57ml9FIF90KRLCcg8EWi> (TD) pel7H2PdH4sbVcD2pwwxe/Trhk4gfqnm5L9l6K9
- Fondevila, A., & Barrios, M. (2001). The gas production technique and its application to the study of the nutritive value of forages. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 35(3).
- France, J., Dijkstra, J., Dhanao, M. S., Lopez, S., & Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *The British journal of nutrition*, 83(2), 143–50. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10743493>
- Fujisaka, S., Holmann, F. J., Peters, M., Schmidt, A., White, D., Burgos, C., ... Davis, C. (2005). Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua Introducción. *Pasturas Tropicales*, 12(2), 73–92. Recuperado a partir de <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/pages/view/Pasturas>
- Gemeda, B. S., Hassen, A., & Home, J. (2014). *In vitro* fermentation , digestibility and methane production of tropical perennial grass species. *Crop & Pasture Science*, 65(5), 479–488. <http://doi.org/10.1071/CP13450>
- González, B. (1994). Conservación de forrajes y consideraciones técnico-económicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 11(2), 190–205. Recuperado a partir de <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/11525/11515>
- Gutiérrez, D., Rojas, E. B., Hernández, R. R., Rodríguez, Z., Stuart, R., & Sarduy, L. (2015). Evaluación de la composición química y degradabilidad ruminal in situ de ensilaje mixto con *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-169: *Moringa oleifera*. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 19(3), 7–16. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83743886002>

- Heinritz, S. N., Martens, S. D., Avila, P., Hoedtke, S., Addah, W., Baah, J., Nussio, L. G. (2012). The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology*, 174(3–4), 201–210. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.017>
- Hoedtke, S., & Zeyner, A. (2011). Comparative evaluation of laboratory-scale silages using standard glass jar silages or vacuum-packed model silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 841–849. <http://doi.org/10.1002/jsfa.4255>
- Holguín, V.A. 2005. *Análisis comparativo y evaluación financiera de modelos de manejo nutricional en fincas de ganado de doble propósito en la zona del Pacífico Central de Costa Rica*. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Holmann, F., Rivas, L., Argel, P., & Pérez, E. (2004). Impacto de la adopción de pastos Brachiaria: Centroamérica y México (*Documento de Trabajo No. 197*). Palmira: CIAT/ ILRI. Recuperado a partir de <http://hdl.handle.net/10568/2212>
- Huisden, C. M., Adesogan, A. T., Kim, S. C., & Ososanya, T. (2009). Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 690–697. <http://doi.org/10.3168/jds.2008-1546>
- Jama, B., Palm, C. A., Buresh, R. J., Niang, A., Gachengo, C., Nziguheba, G., & Amadalo, B. (2000). *Tithonia diversifolia* as a green manure for soil fertility improvement in western Kenya: A review. *Agroforestry Systems*, 49(2), 201–221. <http://doi.org/10.1023/A:1006339025728>
- La O, O., Valenciaga, D., González, H., Orozco, A., Castillo, Y., Ruíz, O., ... Arzola, C. (2009). Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum Purpureum* vc. Cuba CT-115 en la cinética y producción de gas in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43(2), 149–152. Recuperado a partir de https://www.researchgate.net/publication/237027959_Efecto_de_la_combinacion_de_Tithonia_diversifolia_y_Pennisetum_Purpureum_vc_Cuba_CT-115_en_la_cinetica_y_produccion_de_gas_in_vitro
- Leng, R. A. (2008). *The Potential of Feeding Nitrate to Reduce Enteric Methane Production. The Department of Climate Change Report. Australia*. Recuperado a partir de <http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final Modified 17-9-2008.pdf>
- Lezcano, Y., Soca, M., Sánchez, L. M., Ojeda, F., Olivera, Y., Fontes, D., ... Santana, H. (2012). Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, 35(3), 283–291. Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000300004

- Lovett, D., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J., & O'Mara, F. P. (2003). Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livestock Production Science*, 84(2), 135–146. <http://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2003.09.010>
- Mahecha, L. Rosales M. (2005). Valor nutricional del follaje de Botón de Oro (*Tithonia diversifolia* [Hemsl.] Gray), en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*. 17(9), 9 <http://www.lrrd.org/lrrd17/9/mahe17100.htm>
- Mc Geough, E. ., O'Kiely, P., Hart, K. J., Moloney, A. P., Boland, T. M., & Kenny, D. A. (2010). Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *Journal of Animal Science*, 88(8), 2703–2716. <http://doi.org/10.2527/jas.2009-2750>
- McDonald, P., Henderson, N., & Heron, S. (1991). *The Biochemistry of Silage*. Experimental Agriculture (2nd., Vol. 28). Cambridge, UK: Cambridge University Press. <http://doi.org/10.1017/S0014479700023115>
- Menke K. H., and Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Resolution Development*, 28, 7-55.
- Molina Botero, I. C., Cantet, J. M., Montoya, S., Correa Londoño, G. A., & Barahona Rosales, R. (2013). Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 15–31. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072013000200002
- Moss, A. R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 231–253. <http://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Muck, R. E. (2004). *Effects of corn silage inoculants on aerobic stability*. Transactions of the ASAE, 47(4), 1011–1016. Recuperado a partir de <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=9704&content=PDF>
- Ogundare, A. O. (2007). Antimicrobial effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* Leaf Extracts. *Trends in Applied Sciences Research*, 2(2), 145–150. <http://doi.org/10.3923/tasr.2007.145.150>
- Pinto-Ruiz, R., Hernández, D., Guevara, F., Gómez, H., Medina, F., Hernández. A., Jiménez, J.A., Alfonso, E., Mendoza, P. & Ruiz, B. (2010). Preferencia de ovinos por el ensilaje de *Pennisetum purpureum* mezclado con arbóreas forrajeras tropicales. *Livestock Research for Rural Development*, 22(106). Recuperado de <http://www.lrrd.org/lrrd22/6/pint22106.htm> [Consultado 16-10- 2016].

- Posada SL y Noguera RR. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 17(4), from <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>
- Roa, M. L., Castillo, C. A., & Téllez, E. (2010). Influencia del tiempo de maduración en la calidad nutricional de ensilajes con forrajes arbóreos. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 1(1), 63–73. Recuperado a partir de http://www.sistemasagroecologicos.co/images/revistas/2010_1/articulo_6.pdf
- Rosales Méndez, M. (1999). Mezclas de forrajes: uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. En *Agroforestería para la producción animal en América Latina* (pp. 201–231). Roma: FAO.
- Schofield, P., Pitt, R. E., & Pell, A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science*, 72(11), 2980–2991. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730194>
- Singh, S., Kushwaha, B. P., Nag, S. K., Mishra, A. K., Singh, A., & Anele, U. Y. (2012). *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*, 178(1), 2–11. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.08.019>
- Sonka, D. (1997). *Tithonia* weed- A potential Green manure crop. *Echo Development Notes*, 57, 5-6.
- Stefanon, B., Pell, A. N., & Schofield, P. (1996). Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. *Journal of Animal Science*, 74(5), 1104–15. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8726744>
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3), 185–197. [http://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](http://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (2nd.). Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vargas, B.R. (2002). *Pastos y forrajes*. Serie Tecnología Agropecuaria 6. Bogotá: ICFES; editorial Guadalupe. pp. 106-112

- Verdecia, D., J. Ramírez, I. Leonard, Y. Álvarez, Y. Bazán, R. Bodas, S. Andrés, J. Álvarez, F. Giráldez & S. López. (2011). Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Cauto. *REDVET* 12(5), 1-13. Recuperado de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80052016199&partnerID=40&md5=b0f34cb6af9be8ba1d73baa22c71ecfb> [Consultado en 08-12-2015]
- Wattiaux, M. (2000). *Introduction to Silage-Making* (Feeding No. 502). Dairy Update. Recuperado a partir de <https://es.scribd.com/document/226914024/du-502-en>
- Yokota, H., Kim, J. H., Okajima, T., & Ohshima, M. (1992). Nutritional quality of wilted napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) ensiled with or without molasses. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 5(4), 673–679. <http://doi.org/10.5713/ajas.1992.673>
- Zhao, G.-J., Xi, Z.-X., Chen, W.-S., Li, X., Wang, Y., & Sun, L.-N. (2012). Two New Cerebrosides from the Aerial Parts of *Tithonia diversifolia*. *Helvetica Chimica Acta*, 95(7), 1169–1174. <http://doi.org/10.1002/hlca.201100522>

7. Efecto de la mezcla ensilada de *Penisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia* sobre la fermentación ruminal *in vitro* y su emisión de metano en el sistema RUSITEC

V.A. Holguín^{1,2}, H.M. Cuchillo^{3,4}, J. Mazabel³, S. Quintero³ and J. Mora-Delgado².

¹ National University of Colombia, Palmira. A.A 237, Palmira – Colombia; ² Research Group of Livestock Agroforestry Systems, University of Tolima, A.A. 546, Ibagué – Colombia, Email: vholguin@ut.edu.co; ³ International Center for Tropical Agriculture (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia; ⁴ Animal Nutrition Department, National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubirán”, 14000 D.F, Mexico.

Email: vholguin@ut.edu.co

Resumen

Los ganaderos del trópico tradicionalmente han usado dietas a base de especies de pastos con limitaciones nutricionales. Tal deficiencia, exigen el uso de alimentos suplementarios, como leguminosas forrajeras u otras especies leñosas no leguminosas de alta calidad proteica. Se evaluó el patrón de fermentación ruminal y la liberación de CH₄ en un sistema de Simulación del Rumen (RUSITEC) utilizando como ensilaje control *Pennisetum prurpureum* al 100% (T1) versus ensilaje de una mezcla (67% *Pennisetum prurpureum* / 33% *Tithonia diversifolia*) enriquecido, o no, con aditivos: T2, sin aditivo; T3, *Lactobacillus paracasei* T735; T4 inóculo comercial SIL-ALL^{®4x4}. Se probaron los efectos del ensilado en base a MS Se hizo un suministro diario de MS para mantener constante el flujo en el sistema y evaluar los cuatro tratamientos, durante el periodo de ocho días. Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar. No hubo efecto de los tratamientos (T2, T3 y T4) versus control (T1) en la concentración de NH₄'N (p <0.05). En comparación con el control, T4 redujo VFA en un 57% (p <0.0001). T4 redujo el CH₄ liberado, frente al control (T1) 1.36 y 2.43 (mmol/g), respectivamente (p <0.05), sin embargo, T3 también presentó una reducción importante. La reducción de la población de protozoos ciliados no

mostró diferencias ($p > 0.05$). La disminución en la emisión de CH_4 por gramo de MS en ensilajes (PP/TD), posiblemente se explica por una menor degradación de la fibra y sugiere que habrá menos emisiones de CH_4 por unidad de proteína comestible producida. Sin embargo, la cantidad total de metano que se libera no fue diferente estadísticamente.

Palabras clave: Defaunación, Fibra, Protozoos, Digestión; Ensilaje

Abstract

Topical livestock farmers have traditionally used diets based on grass species with significant nutritional limitations. Such deficiency, demand the use of supplementary food as forage tree legumes or other non-leguminous woody species of high quality protein. Ruminal fermentation pattern and methane release were determined in a Rumen Simulation Technique system (RUSITEC) using as control silage at 100% *Pennisetum prurpureum* (T1) versus silage mixed (67% *Pennisetum prurpureum* / 33% *Tithonia diversifolia*) enriched, or not, with additives: T2, without additive; T3, *Lactobacillus paracasei* T735; T4 commercial inoculum SIL-ALL^{®4x4}. The effects of silage in a dry matter basis to the system were tested. Daily dry matter supply was kept constant to evaluate the four treatments during eight days-term period. Data were analyzed as a randomized complete design. There was effect of treatments (T2, T3 and T4) versus control (T1) on ammonia concentration ($p < 0.05$). As compared to control, T4 reduces VFA by 57% ($p < 0.0001$). T4 reduced methane release respect to control on 1.36 and 2.43 (mmol/g), respectively ($p < 0.05$), however, T3 presented an important reduction too. The reduction of ciliate protozoa population was not showed differences ($p > 0.05$). The decrease in methane emission per gram of DM on PP/TD silages, is most likely explained by lower fiber degradation and suggests that there will be less methane emission per unit of edible animal protein produced; even though the total amount of methane released is not different statistically.

Key words: Defaunation, Fiber, Protozoa, Digestion; Silage

7.1 Introducción

La zona tropical contiene la mayor diversidad genética en el mundo, diversidad que se expresa en el gran número de plantas vasculares por unidad de área (Rosales, 1998). En la zona tropical existe la mayor biodiversidad genética de plantas vasculares por unidad de área del mundo, expresada en el gran número de plantas vasculares por unidad de área, no obstante esta riqueza, los sistemas de alimentación animal se han basado principalmente en el uso de muy pocas especies vegetales, siendo más reducida la gama de árboles y arbustos forrajeros (Rosales, 1998). Por ello, ante la enorme demanda de carne y leche proyectada para alimentar a una población humana y ante los altos costos de producción de las materias primas para la alimentación animal, es importante recurrir a esta biodiversidad para buscar otras fuentes alimentarias y aprovechar así la oferta natural local de manera racional.

Los productores del trópico tradicionalmente han utilizado dietas basadas en el asocio de gramíneas, nativas o introducidas, con significativas limitaciones nutricionales, derivadas de los altos contenidos de pared celular, que se traducen en una baja ingestión y por tanto limitado consumo de nutrientes digeribles. Generalmente, esto se debe a una fermentación microbiana deficiente que se refleja en un flujo y una absorción de nutrientes inferior a la que requieren los rumiantes (Bernal, 2007). Tal deficiencia demanda el uso de alimentos suplementarios (Lazcano, 1996), así como la introducción de leguminosas en pasturas de gramíneas (Hess et al., 2003), la suplementación con forraje de leguminosas arbustivas (Abreu, 2003) o la suplementación con otras especies leñosas no leguminosas de alta calidad proteica (Gómez et al., 1995).

La mezcla de la diversidad de especies en la dieta de los rumiantes ha sido concebida como una alternativa eficiente para mejorar la oferta proteica y energética en el trópico (Rosales, 2003). Tal alternativa puede concebirse como la oferta de mezclas de forrajes ofrecidos mediante ramoneo, corte acarreo o prácticas de conservación de forrajes por procesos de ensilaje (Roa et al., 2010). Una mezcla apropiada para mantener un balance adecuado de proteína energía lo constituye una proporción de 70:30, entre la fuente de energía y la fuente proteica, así, generalmente la mezcla comúnmente usada se ha conformado entre gramíneas y leguminosas en la proporción señalada (Ojeda, 2001). No

obstante, la fuente proteica puede ser otra planta no leguminosa, entre la gran diversidad de leñosas forrajeras que existen en el trópico (Pinto-Ruiz, Hernández D., Guevara, Gómez, Medina, Hernández A., Jiménez, Alfonso, Mendoza, & Ruiz., 2010; Gómez, et al., 1995). *Tithonia diversifolia* ha constituido una de las especies predilectas usadas en alimentación animal, por su alto contenido proteico, alta digestibilidad y versatilidad en el manejo. Un estudio de Lezcano, Soca, Sánchez, Ojeda, Olivera, Fontes & Santana, (2012) reporta datos de MS para *T. diversifolia* que varían desde 13.5% hasta 25.0%, en función de la edad y la frecuencia de corte y los valores de proteína bruta las cuales variaron entre 11.0 y 29.8%, con diferencias significativas entre las hojas para los 30 y 60 días. Por su parte, Fasuyi & Ibitayo, (2011) reporta que las hojas de *T. diversifolia* poseen un alto contenido de proteína bruta (20.6%). En cuanto al contenido de fibra cruda los reportes oscilan entre 3.16 y 3.07 a los 30 y 60 días respectivamente, mientras que para hojas los valores oscilan entre 3.95 y 5.29% (Hojas y tallos respectivamente) en época lluviosa, valores que se incrementan en la época seca (Lezcano et al., 2012).

Por otra parte, el ensilaje constituye una estrategia de conservación de los nutrientes (Gonzales, 1994) basada en la fermentación anaeróbica gobernada por bacterias del genero *Lactobacillus* (Wattiaux, 2000). Sin embargo, el conocimiento del proceso de acidificación del medio y la ensilabilidad de *T. diversifolia* es limitado; esto obliga a evaluar el potencial acidificador de las cepas nativas de *Lactobacillus* (Holguín et al., 2013) y la estabilidad del ensilaje y la reducción de las pérdidas de nutrientes bajo condiciones aerobias, una vez que el ensilaje es expuesto a condiciones aerobias (Honig & Woolford, 1980; Acevedo y Zeledón, 2009). Al respecto, existen reportes que indican una optimización del proceso de fermentación anaeróbica inducido por mezclas que pueden mejorar las características del alimento (Bernal, 2007; Hess et al., 2003), especialmente con *T. diversifolia* (Fasuyi, Dairo & Ibitayo, 2010).

Las técnicas de simulación de la fermentación ruminal (mediante cultivos continuos como el RUSITEC) y de producción de gas, constituyen dos de los procedimientos experimentales *in vitro* más utilizados en la actualidad para el estudio de los procesos de fermentación ruminal, pues permiten el control de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación y de los factores de variación que la afectan (Rymer, Huntington, Williams & Givens, 2005).

Los métodos de simulación se basan en el mantenimiento de pequeñas cantidades de fluido ruminal bajo condiciones ambientales (anaerobias, de temperatura y cinética) controladas, de modo que la biota microbiana pueda actuar a discreción sobre la materia prima en prueba (Boudry, 2003; Menke & Steingass, 1988). Entre los métodos de simulación usados por investigadores está el Artificial Rumen Simulation System - RUSITEC (Abel, Irmgard, da Costa Gómez & Steinberg, 2001). En este sistema, un equipo debidamente acondicionado permite el mantenimiento de una población normal del fluido ruminal, bajo condiciones estrictamente controladas durante largos períodos de tiempo (Martínez et al., 2010). Este sistema fue desarrollado por Czerkowsky & Breckenridge (1977) y modificado por Machmuller, Soliva, & Kreuzer, (2002) y se usa, específicamente, para determinar la fermentación, mediante la simulación de actividades fisiológicas de la digestión ruminal, permitiendo simular la fermentación ruminal durante períodos de tiempo relativamente largos.

En este estudio se analiza el efecto del ensilaje de *Penisetum purpureum* y *T. diversifolia* sobre la fermentación ruminal simulada y la producción de CH₄ en un sistema RUSITEC. Esta técnica de simulación de rumen permite analizar la fermentación *in vitro* durante una escala de tiempo suficiente que evidencie la posible adaptación de los microbios a en el rumen (Patra & Saxena, 2009). El objetivo de este estudio es determinar el efecto del ensilaje de *P. purpureum* y *T. diversifolia* sobre la fermentación ruminal simulada y la producción de CH₄ en un sistema RUSITEC.

7.2 Materiales y Métodos

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Calidad de Forrajes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), coordenadas geográficas 3°30'09" N y 76°21'18" O, localizado en el Municipio de Palmira (Valle del Cauca).

En el experimento *in vitro* realizado en el sistema de simulación RUSITEC, desarrollado por Czerkowsky & Breckenridge (1977) y modificado por Machmuller et al., (2002). Se evaluaron ensilajes con un nivel de sustitución de *Pennisetum purpureum* por *Tithonia diversifolia* comparado con un testigo con solo *P. purpureum*. Se prepararon microsilos con o sin enriquecimiento de inóculos. Cada uno de estos tratamientos y un testigo se hizo

por triplicado (Tabla 7-1). Se simuló la fermentación ruminal, para las actividades fisiológicas de la digestión, exceptuando la de absorción de nutrientes.

Tabla 7-1. Tratamientos analizados en el proceso de digestión en microsilos

	Mezcla (%)	Inoculo	Repeticiones
T1	PP (100)	Sin inoculo	3
T2	TD /PP (33/67)	Sin inoculo	3
T3	TD /PP (33/67)	T735	3
T4	TD /PP (33/67)	SIL-ALL ^{®4x4}	3

El sistema RUSITEC consta de ocho tubos fermentadores que permiten la evaluación simultánea de máximo ocho tratamientos. En este estudio, se tuvieron 4 tratamientos con dos repeticiones, período experimental de 10 días para cada uno, de los cuales los primeros cuatro días corresponderán al período de adaptación de los microorganismos a las dietas experimentales y los siguientes seis días para la recolección de datos y toma de muestras.

Se tomaron los ocho tubos fermentadores y se les adicionó 890 ml de líquido ruminal y 110 ml de solución buffer ó saliva artificial (McDougall, 1948). El líquido ruminal, previo a su adición se filtró a través de cuatro capas de gasas. El flujo de saliva artificial se dosificó en una bomba que garantizó el suministro continuo de 500 ml por día cada fermentador, equivalente a una tasa de dilución de 0.5 por día.

Al inicio de cada período experimental se puso a incubar 60g de contenido ruminal y 16g de MS de los ensilajes experimentales empacadas por separado para cada tubo fermentador. Las dietas se empacaron en bolsas de nylon con medidas de 13.5 x 6.5 cm (Nltx 03-100/32, SEFAR, Heiden, Suiza) y poros de 100 µm. Luego, cada 24 horas se reemplazó una de las bolsas por una nueva, empezando con la bolsa que tenían contenido ruminal, para tener cada bolsa incubada por 48 h. Posterior al cambio de las bolsas, el aire de los fermentadores se desplazó con N₂ para restablecer las condiciones anaeróbicas. Las bolsas se retiraron de los fermentadores y se lavaron con agua fría hasta que el agua salió clara y se almacenaron a -20°C.

La alimentación de los fermentadores fue diaria, y cuatro horas antes de hacer esta alimentación se tomaron muestras de líquido ruminal para determinar el potencial redox, el pH, concentración de amonio y el recuento de microorganismos. El gas colectado se almacenó en bolsas Supel™ Inert Foil Gas Sampling Bags, Screw Cap Valve 10 Liter y se cuantificó mediante desplazamiento de agua.

Análisis bromatológico.

Antes del proceso de digestión en RUSITEC a las muestras de cada tratamiento se le determinó la composición química al igual que después del proceso a los residuos de la incubación.

Los análisis bromatológicos de calidad nutricional han sido efectuados siguiendo las normas AOAC 930.15, NFTA Method 2.1.4 para determinación de en horno a 105°C, AOAC 973.18, NFTA Method 4.1 para Fibra detergente Ácida (FDA), Van soest (1991) para fibra detergente Neutra (FDN), Tilley & terry (1963) modificado por Moore (1970) para la metodología de Digestibilidad *in vitro* de la MS y para la determinación de Proteína cruda (PC) por Kjeldahl se aplica la norma AOAC 984.13. La digestibilidad estimada de la materia seca (DEMS) fue determinada mediante la formula de Mertens (1987)

Para hacer la determinación de la concentración de amonio se hizo siguiendo las instrucciones del manual for Ammonia Electrode (NH₃); Mettler Toledo. Para esto se calibraron 3 puntos (10 y 100 mmolar) tomando en cada calibración 20 ml de la solución molar se agitó y se le agrego 1 ml de hidróxido de Na y así sucesivamente con los otros dos puntos (10 y 100 mmolar) una vez calibrado se toma la muestra la cual a 1 ml de inoculo se le adicionó 18 ml de agua destilada y 1 ml de hidróxido de Na y se hizo la lectura

7.2.1 Determinación de pH y Potencial Redox

La determinación de potencial redox y del pH se hizo con un equipo acondicionado para tomar ambas lecturas, modelo SG8, marca Mettler-Toledo serie: B 337764747. Para esto se tomaron 6 ml del líquido ruminal de cada fermentador y se hizo la medición con el electrodo respectivo. Los equipos fueron calibrados antes de iniciar la toma de los datos.

7.2.2 Recuento de Protozoarios

Para el recuento de protozoarios se tomó 2000 μL de solución Hayem (HgCl_2 , 2.5 g/L; Na_2SO_4 , 25 g/L; NaCl , 5.0 g/L) y 500 μL de líquido ruminal (días 0 y 1) ó 100 μL de solución Hayem y 1000 μL del líquido ruminal (días 2 a 8) en tubos plásticos. Para el recuento se utilizó la Cámara NEUBAUER, 0.1 mm Deep HAUSSER SCIENTIFIC. Luego se contaron los protozoarios presentes en el total del área de la cámara siguiendo la metodología de (Rojas, 2011).

7.2.3 Determinación de Metano

Para la determinación del (CH_4) se utilizó un cromatógrafo: Shimadzu GC-2014. Columna: Shimadzu; el cual posee una serie de columnas empaquetadas para metano: 4m H-D 80/100, 0.7m S-Q y 1.5 P-N. Temperatura columna: 80°C. Temperatura del detector: FID 25°C. Temperatura del inyector: la inyección en este equipo se maneja directo a un cable, el cual está a temperatura ambiente, pues no se hace por puerto de inyección tradicional como lo manejan otros equipos. Gas de arrastre: Nitrógeno Column Flow: 30.83 mL/min.

7.3 Resultados y Discusión

En la Tabla 7-2 se presenta la composición química de los ensilajes que se sometieron a un proceso de digestión en el RUSITEC. Se observa que el nivel de PC de los ensilajes que incluyen TD fue mayor en dos puntos que el T1, sin embargo, no hubo diferencias significativas ($p = 0.5180$). Por otra parte, también es evidente que el nivel de fibra (FDN) fue mayor en T1 ($p < 0.0001$) con diferencias significativas respecto a los otros tratamientos, siendo T3 el ensilaje en el cual este parámetro fue significativamente menor. En el caso de FDA, el efecto de tratamiento no presentó diferencias significativas, aunque se muestra una ligera tendencia a disminuir en el T3. Las cenizas mostraron diferencias significativas en T3 respecto a T1 y T2 ($p < 0.0141$). La materia orgánica fue significativamente mayor en T3 respecto a T1 y T2.

Estos valores bromatológicos deberían reflejarse en la digestibilidad de la MS, sin embargo no se ve una clara tendencia, en virtud que en las mezclas la dieta T2 es la más alta en pared celular (FDN) y en FDA y que presentó uno de los menores porcentaje de DIVMS aunque entre ellos no hay diferencias estadísticas ($p=2007$). El control es el que mejor

respuesta de digestibilidad presenta, lo cual podría deberse a la presencia de una proporción importante de tallos de TD en los tratamientos T2, T3 y T4 que incluyen este forraje.

El contenido de PC en los tratamientos con inclusión de TD (T2, T3 y T4) fue mayor que T1 (sólo PP). Principalmente, el ensilado preparado con PP/TD y enriquecido con T735 es el que tiene la PC más alta (7.8%), que es parecida a la proteína de ensilaje obtenido por Roa et al. (2010), que alcanzó el 8% y 6%, a los 30 y 90 días respectivamente.

Ambas fibras (FDN y FDA) tienen una respuesta opuesta ya que con el incremento del nivel de inclusión de TD, el porcentaje de FDN se reduce. Ya en el Capítulo 6 se había demostrado que los datos indican un efecto positivo estadísticamente significativo de inóculos (T735 y SIL-ALL^{®4x4}) sobre la fibra, puesto que el porcentaje de fibra es menor en el ensilaje inoculado ($p < 0.05$).

Barahona & Sánchez (2005) sugieren que el contenido de (FDN) en los forrajes oscila entre 30 y 80% y que entre mayor es la proporción de fibra, disminuye la productividad de los animales que los consumen. Esto se asocia con el consumo de MS, así, mientras mayor sea el contenido de fibra, mayor será el tiempo de retención en el rumen, lo que disminuye el consumo voluntario de forraje. Cabe señalar que la FDN obtenida en los ensilajes que contienen TD fue entre 15 y 19 puntos más alta de los reportados en los ensilajes de esta misma especie reportados por Roa et al. (2010) que fue de 54.5%; también la FDA reportada por este autor fue más alta (32%) en 90 días de ensilaje. Estas diferencias posiblemente obedecen al estado de madurez de los forrajes, las cuales en este ensayo tuvieron una edad mayor que el usado en los microsilos señalados en el capítulo 6.

Según Tomich et al. (2004) los contenidos de FDN y FDA se correlacionan negativamente con DIVMS, así, altos contenidos de pared celular y una baja digestibilidad pueden restringir el uso de los ensilajes como raciones para bovinos y ovinos.

Tabla 7-2. Composición bromatológica de los ensilajes analizados antes de RUSITEC (valores expresados como porcentaje de la materia seca)

Variable		T1		T2		T3		T4	
		Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
MS	%	92.46	0.01b	92.52	0.04bc	91.77	0.08a	92.74	0.1c
PC	%	5.55	0.64a	7.20	1.70a	7.80	1.13a	7.50	2.12a
FDN	%	74.05	0.11a	69.1	0.63b	65.09	0.07c	68.56	0.3b
FDA	%	51.02	0.00a	52.15	1.31a	49.92	0.18a	51.21	0.4a
Cenizas	%	12.51	0.01b	11.96	0.29b	10.91	0.07a	11.71	0.4ab
MO	%	87.49	0.01a	88.04	0.29a	89.09	0.07ab	88.29	0.4b
DEMS	%	49,15	0,00 a	48,28	1,02 a	50,01	0,14 a	49,01	0,34 a

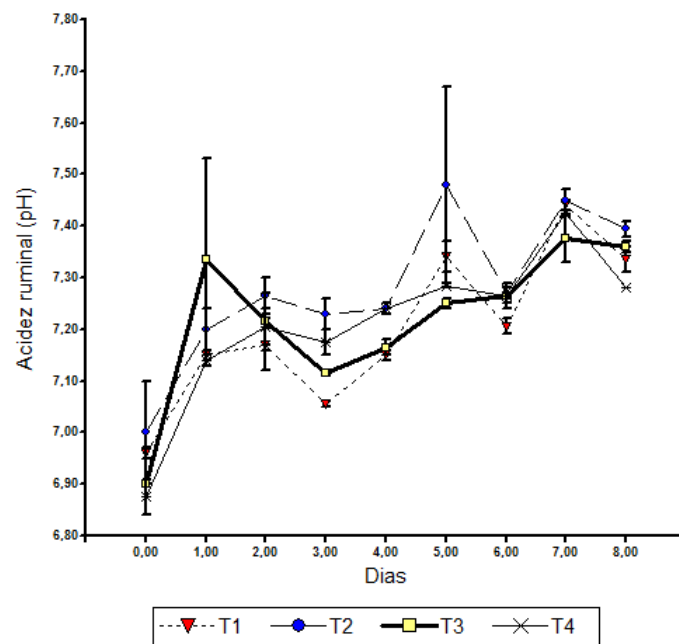
7.3.1 Características del Líquido Ruminal

El proceso de fermentación al interior de RUSITEC después de 8 días, indica que las características del líquido ruminal aislado (Figura 7-1), durante la evaluación de las dietas presenta un ligero aumento en el pH respecto a la acidez normal del rumen oscilando entre 7.3 y 7.4, sin embargo, entre tratamientos no presentó variación significativa ($p > 0.05$). Es probable que el incremento de pH constituya una respuesta a una dieta básicamente fibrosa, dado que la fibra larga estimula la rumia y la secreción puede incrementar la producción de saliva (Krause & Oetzel, 2006), la cual actúa como lubricante del alimento consumido, con un pH 8.2 en promedio, alto contenido de sodio, potasio, bicarbonato y fosfato (Emery, Smith, Grimes, Huffman, & Duncan, 1960; Krause & Oetzel, 2006). Estas características que se simulan en la saliva artificial del RUSITEC, podrían tender a subir el pH en el licor ruminal para luego estabilizarse por su capacidad buffer. Además de este efecto de la saliva artificial, la tendencia creciente, desde un pH ácido hacia la basicidad, puede explicarse en la tendencia a la baja, a medida que transcurren los días, de la producción de ácidos orgánicos.

El equilibrio del ambiente ruminal se mantiene gracias a la solución tampón derivada de la secreción salival alcalina, que modula la acidez propia de la fermentación de carbohidratos en el rumen el cual se debe mantener alrededor de 5.8 - 7 por lo que tiende a mantener el pH del rumen cerca de la neutralidad (Wattiaux, 2000; Krause & Oetzel, 2006). De todos los factores del medio ruminal, el pH es el más susceptible a variación, y la ración es el factor más determinante de los cambios. El mantenimiento del pH ruminal es el resultado

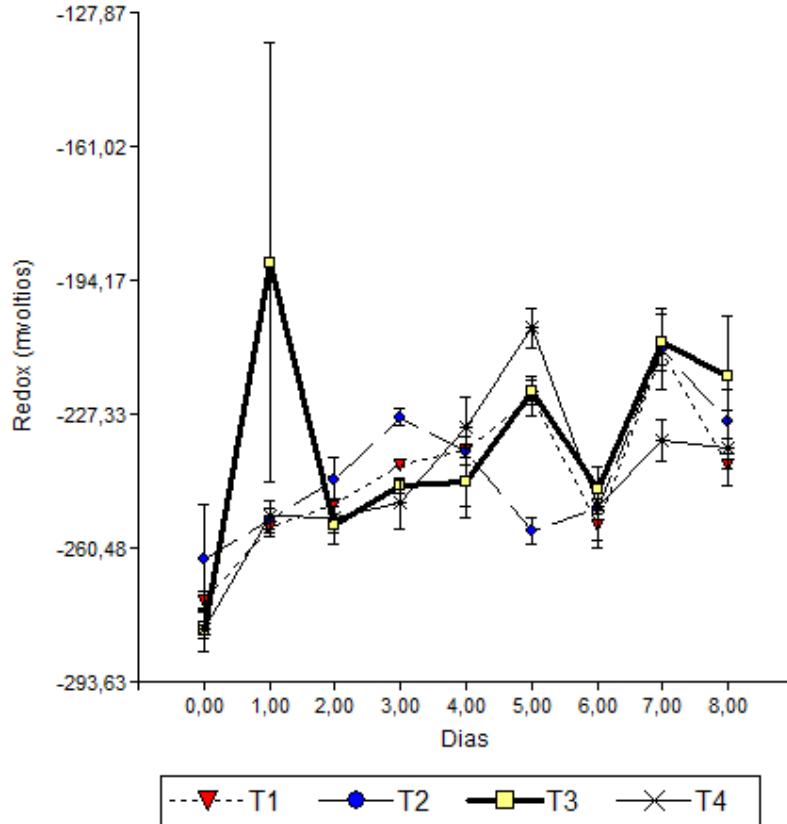
de la producción y la neutralización o eliminación de protones en el medio ruminal (Calsamiglia & Ferret 2002). Mientras que las fermentaciones de CNE son energéticamente más eficientes, son altamente acidogénicas, y su aportación debe limitarse y/o contrarrestarse con CE, ya que éstos aportan capacidad tamponante al medio ruminal (Calsamiglia & Ferret, 2002).

Figura 7-1. Acidez del rumen simulada en RUSITEC durante los 8 días después del inicio de la fermentación



El potencial redox se mantuvo en los niveles adecuados del ambiente ruminal (Figura 7-2), sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$); esto sugiere una simulación en el RUSITEC muy aproximada al ambiente anaerobio del rumen. Allí, es posible encontrar algo de oxígeno en ocasiones, producto posiblemente, de su introducción a través del alimento ingerido o el agua (Church, 1974). Así, la baja concentración de oxígeno, según lo indica un potencial negativo de oxidación (Eh) generan un Eh entre -250 y -450 milivoltios (mV), el cual estimula el crecimiento de microorganismos anaerobios (Araujo & Vergara-López, 2007). Similarmente los resultados de Bernal (2007) sugieren que dietas basadas en forrajes leguminosos no alteraron este parámetro, manteniéndose entre -137.3 y -322.

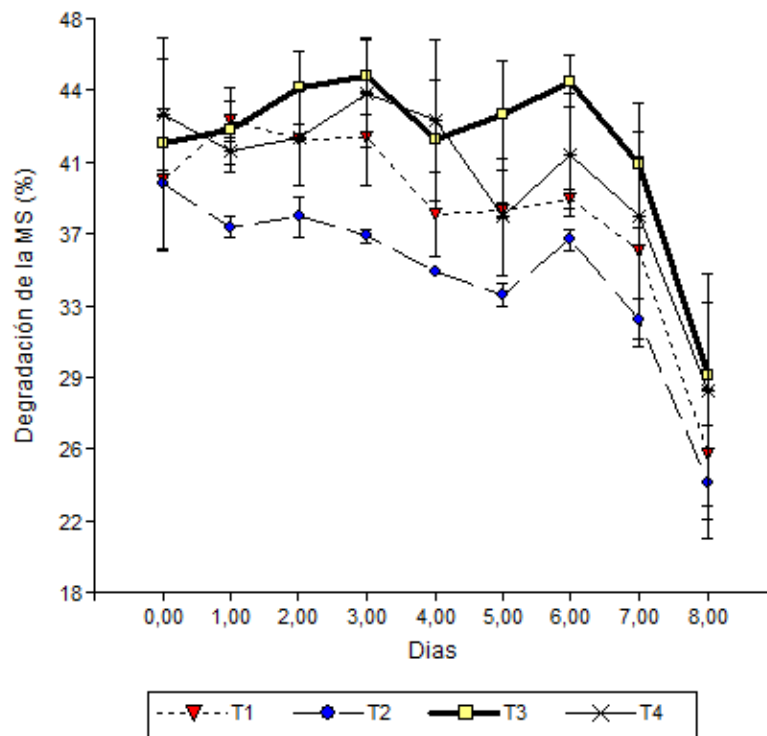
Figura 7-2. Potencial redox simulado en RUSITEC durante los 8 días después del inicio de la fermentación



7.3.2 Degradación de la Materia Seca

La degradación media de la MS en 8 días de digestión en RUSITEC fue significativamente más alta ($p < 0.0001$) en T3 (41.33 ± 5.63) respecto a T1 (37.88 ± 5.76) y T2 (34.61 ± 4.79) (figura 7-3) aunque sin diferencias significativas frente a T4 (39.71 ± 5.90). El análisis longitudinal permite apreciar diferencias ($p < 0.0001$) de la degradación después de 8 días respecto al inicio. La figura 7-3 permite apreciar que las dietas con inclusión de TD en el ensilaje reflejan una mayor degradación de la MS, lo cual es explicado por el menor contenido de fibra de las dicotiledóneas proteicas no leguminosas y una mayor digestibilidad y degradabilidad de los forrajes, inversamente relacionados con su contenido de FDN (Barahona & Sánchez, 2005)

Figura 7-3. Degradación de la materia orgánica simulada en RUSITEC durante los 8 días después del inicio de la fermentación



7.3.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

Como se puede ver en la tabla 7-3, la producción de AGV no fue afectada por los tratamientos, mostrando una producción menor para el T3 frente a los otros tratamientos y el control; sin embargo, no hubo diferencias significativas. Es de anotar que con una dieta a base de forrajes, los AGV pueden proveer entre el 50 y el 85% de los requerimientos energéticos del animal; también es importante saber que la proporción entre AGV, gases de efecto invernadero (GEI) como CO₂, CH₄ y H₂ libre es en promedio 65, 27 y 0.2% respectivamente, de los gases presentes en el rumen (Pechin, 1999).

La composición de estos productos de la fermentación difiere entre las dietas. El efecto entre tratamientos, aunque no fue significativo ($p = 0,4875$), sugiere que T1 aumento el drenaje de acetato respecto a los tratamientos que incorporan TD. La misma tendencia se presentó en el drenaje de propionato, aunque sin diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p = 0.3525$). En el caso del butirato, sí presentó diferencias significativas

entre tratamientos ($p < 0.0001$), siendo notoria la mayor producción de este ácido en el control (T1) y más bajo en los tratamientos que incorporan TD, con una menor proporción en los tratamientos T3 y T4 posiblemente, por efecto del inoculo adicionado a estos dos tratamientos.

Es sabido que para el rumiante, la formación de propionato es energéticamente más eficiente que la de butirato y que la de acetato, ya que la producción de estos dos últimos lleva al escape de átomos de carbono que no pueden ser quemados, en forma de CH_4 (o átomos de H que no se convierten en AGV) (Pechin, 1999). Eso significa que las dietas de solo gramíneas conducen a una alta segregación de butirato, perdiendo carbonos en forma de CH_4 .

Similar a lo reportado por García-González, González & López (2010) en una evaluación de aditivos probados en RUSITEC, en este estudio se verifica que si bien el total de AGV no fue afectado por los tratamiento, su perfil fue notablemente cambiado. Esto se confirma en que hubo diferencias significativas en la relación acetato/propionato, siendo significativamente mayor en T4 y T3 ($p = 0.0009$), respecto a T1. Según Jarrige, Ruckbusch, Demarquily, Farce, & Journet (1995), la proporción molar de los AGV en el rumen es: acético (65%); propiónico (20%); butírico (13%) y otros (2%). Los perfiles de estos ácidos en el presente estudio están ligeramente alterados, sin embargo, se conserva la tendencia, siendo evidente que es en el T4 donde se encuentran las proporciones más cercanas a las sugeridas por Jarrige et al. (1995): 60.7; 26.7; 9.7 y 2.9% para los ácidos acetato, propionato, butirato y otros, respectivamente.

En dietas totalmente a base de forrajes, la relación Acetato: Propionato se acerca a 3: 1 pero, a medida que se aumenta el porcentaje de concentrados en la dieta, la relación se estrecha a 2: 1 o menor (Pechin, 1999).

7.3.4 Nitrógeno Amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$)

La producción de $\text{NH}_3\text{-N}$ (como medición del metabolismo del N dietario) fue más baja en los tratamientos que incluyeron TD. Esto podría indicar una más baja degradación de la proteína dietaria en estos tratamientos.

El más alto nivel de amonio en el T1 está probablemente relacionado a una mayor proteólisis. La producción diaria de $\text{NH}_3\text{-N}$ (como medida del metabolismo dietético del N) cambió a lo largo del tiempo en todos los tratamientos ($p < 0.0001$). En general, los valores se incrementaron el primer día pero luego decrecieron gradualmente, confirmando el desempeño de este parámetro reportado por Martínez et al. (2010).

En el día ocho $\text{NH}_3\text{-N}$ fue más alto en T1 con diferencias significativas frente a los tratamientos que incorporan TD. Sin embargo, a pesar de lo similar de la digestibilidad de la MS en los tratamientos que contienen TD, $\text{NH}_3\text{-N}$ fue más bajo en T3, pero sin diferencias significativas frente a T4 y T2. Se observó esta respuesta a pesar de la mayor entrada de N en el sistema con T3. Estudios han demostrado que se aumenta la incorporación de N dietético en N microbiano y reduce $\text{NH}_3\text{-N}$ (Lee, Merry, Davies, Moorby, Humphrey, Theodorou, MacRae, & Scollan., 2003; Merry, Lee, Davies, Dewhurst, Moorby, Scollan, & Theodorou, 2006) con forrajes de alta calidad proteica.

Esto indicaría un ritmo más lento la degradación de proteínas en las dietas que incorporan TD. La concentración de amoniaco que se observó en el líquido ruminal en los diferentes tratamientos fue mucho más baja respecto a lo reportado por Abreu et al. (2003) de 3.26 mmol/l, pero más cercana a lo que encontraron Hess et al. (2003) (1.76 mmol/l) al incubar un sustrato compuesto por 1/3 de *Cratylia argentea* y 2/3 de *Brachiaria dictyoneura* en un sistema RUSITEC. Estas cifras están por debajo de la concentración sugerida por Satter & Slyter (1974) de 3.6 mmol/l para maximizar la síntesis de proteína microbiana en el rumen.

7.3.5 Emisión de Metano

El análisis de la producción neta de CH_4 por g de MS, generado a los 8 días de incubación en Rusitec (tabla 7-3.), fueron cercanas a las reportadas por Abreu et al. (2003) de 1.47 y 1.61 mmol/g de MS de una mezcla de heno de *Brachiaria dictyoneura* y con aditivos. Así, los resultados de este estudio indican que estas emisiones fueron mayores en T1 con diferencias significativas frente a T4 que fue el que menos cantidad de CH_4 emitido presentó. El T1 presenta las mayores emisiones dada su condición de ensilaje de gramínea con altos niveles de pared celular.

Debe recordarse que a las 60 h, después del inicio de la incubación en el experimento con la metodología de producción de gases de Theodorou (capítulo 5), se detectó el punto de inflexión, aproximadamente con un 80 a 88% del gas total producido. Esto coincide con lo encontrado en el capítulo 5, en el cual los ensilajes de solo gramínea generaron altos niveles de CH₄ emitido, pero disminuye con la inclusión de TD. A su vez, es consistente con los datos reportados por La O, Valenciaga, González, Orozco, Castillo, Ruíz, Gutiérrez, Rodríguez, & Arzola (2009), que en mezclas de forraje (TD/PP) encontraron una producción descendente de CH₄ (33.3; 30.1 y 28.06 ml) a medida que se incrementa la inclusión de TD en 15, 30 y 100%, respectivamente. Abreu et al. (2003) sugieren que la disminución en la emisión de CH₄ por gramo de MS degradada, es probable que se explique por la menor degradación de la fibra y sugiere que habrá menos CH₄ emitido por unidad de proteína animal comestible, a pesar de la cantidad total de CH₄ liberado no se reduzca.

Tabla 7-3. Efecto de diferentes dietas de la mezcla *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia* sobre la fermentación *in vitro* en el rumen

Variables	Testigo	Mezcla (33% TD + 67% PP)			P valor
	(100% PP)	Sin Inoculo	T-735	Silall	
	T1	T2	T3	T4	
AGV (mmol/l)	50.10±14.2a	40.5A±8.57a	39.87±10.2a	41.18±11.2a	0.3247
Acetato (mmol/l)	27.86±8.5a	23.45±5.1a	24.34±6.2a	25.14±6.5a	0.4875
Propionato (mmol/l)	13.34±2.9a	10.83±2.2a	10.86±2.5a	10.99±2.6a	0.3525
Butirato (mmol/l)	8.35±2.6a	5.87±1.2b	4.22±1.1c	4.26±1.7c	<0.0001
Acetato/Propionato	2.06±0.2c	2.16±0.1bc	2.23±01ab	2.29±0.1a	0.0009
Metano(mmol/g)	2.43±1.1a	1.53±0.9ab	1.42±1.6ab	1.36±1.4b	<0.0001
Amonio (mmol/L)	0.13 ^a ±0.07	0.06bc±0.00	0.05bc±0.00	0.06bc±0.01	<0.0001
Protozoarios (1*10 ⁶)	0.05±0.00a	0.1±0.00a	0.05±0.00a	0.15±0.00a	0.7681

La diferencia en la producción de CH₄ a partir de un ensilaje de PP/TD podría ser debido, en parte, a la acción de taninos condensados (TC), ya que se ha informado que la presencia de estos, en forrajes de especies leñosas, reduce las emisiones de CH₄ (Kamalak, Canbolat, Gurbuz, Ozay, Ozkan, & Sakarya, 2004). El forraje de TD, aunque presenta niveles leves de TC (Lezcano *et al* 2012; Ogundare, 2007), no es despreciable la presencia de estos TC entre un 1.0 y un 1.4%, respectivamente, en épocas de bajas

precipitaciones y estaciones de lluvia (Verdecia, Ramírez, Leonard, Álvarez, Bazán, Bodas, Andrés, Álvarez, Giráldez, & López, 2011).

Por otra parte, la mayor proporción de pared celular en un forraje está relacionada con una mayor producción de CH₄, como es el caso del ensilaje T1. Esto debido a que la baja digestibilidad ruminal de la FDN, significa más FDN sobrepasante del rumen y ser depositada esta en el intestino grueso, donde puede ser fermentada y producir CH₄ por acción de micobios metanogénicos. (Knapp, Laur, Vadas, Weiss, & Tricarico, 2014).

La población de protozoarios, como medida de la biomasa microbiana del rumen constituye un buen indicador, dado su alto peso en la microbiota, pues aunque su número es menor en comparación con las bacterias, estos microorganismos tienen un mayor volumen individual, dando lugar a una masa celular de protozoarios semejante a la masa de las bacterias (Díaz, Galindo, Bocourt, Silva, & Pérez, 2008), además estos microorganismos colonizan y degradan los tejidos vegetales en el rumen y producen enzimas capaces de degradar los polisacáridos vegetales y hemicelulosas (Kozá et al, 2006). En este estudio, esta población cambió a lo largo del tiempo en todos los tratamientos. En general, los valores decrecieron gradualmente durante los tres primeros días, estabilizándose en valores medios sin diferencias significativas ($p > 0.005$) durante los últimos 4 días.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en el recuento de protozoos entre los diferentes tratamientos, sin embargo, entre los tratamientos que contenían TD (T2, T3 y T4) el número de protozoos se redujo en el ensilaje T3 que presentó el más alto porcentaje de PC, lo cual coincide con lo afirmado por Abreu et al. (2003) de que la mayor defaunación se presenta en un sustrato suplementado con una leguminosa de alta calidad. En su estudio, el mismo autor, sugiere que la reducción de la población ciliada (protozoos) está asociada a un potencial de defaunación de los forrajes con altos contenidos de metabolitos secundarios, como taninos y saponinas, que no necesariamente está relacionado con la reducción de la metanogénesis, pero sin duda la utilización de nitrógeno es más eficiente.

7.4 Conclusiones

Las características del líquido ruminal aislado durante la evaluación de las dietas, se mantuvo en los niveles adecuados del rumen.

Las características del líquido ruminal aislado en el RUSITEC, se mantuvo en los niveles propios del rumen.

Tanto el potencial de hidrogeniones como el potencial redox, no presentaron diferencias significativas en sus fluctuaciones tanto en los tratamientos de PP (100%) y en las mezclas PP/TD, con y sin inoculo en el ensilaje.

Los ensilajes que incorporaron Botón de Oro (TD), presentaron la menor cantidad de CH₄ emitido.

Se presentó un ligero aumento en el pH respecto a la acidez normal del rumen (7.3 y 7.4), sin embargo, entre tratamientos no hubo variación significativa.

El potencial redox no presento diferencias significativas entre tratamientos.

El nitrógeno amoniacal, fue más bajo en los tratamientos que incluyeron TD.

Los ensilajes que incorporaron *Tithonia diversifolia* presentaron la menor cantidad de CH₄ emitido. Esta reducción, podría traducirse en condiciones prácticas, en una reducción de CH₄ emitido por unidad de proteína animal producida que sería útil aun cuando la cantidad total de CH₄ emitido no disminuya

7.5 Referencias

Abreu, A, Carulla, J.E. Kreuzer, M. Lascano, C.E., Diaz, T.E., Cano, A. & Hess, H-D. (2003). Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(2),147-154.

- Acevedo Martínez, V.M. & Zeledón Hernández, E.N. (2009). *Estabilidad aeróbica del ensilaje de Marango con diferentes proporciones de Taiwá, Caña de Azúcar y Melaza*. (Trabajo de grado) Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). *AOAC 930.15. Moisture in animal, loss on drying at 135 C for 2 hours*. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Association of Official Analytical Chemists. (2010). *AOAC 973.18. Fiber (acid detergent) and lignin (H₂SO₄) in animal feed*. Gaithersburg, MD, USA.
- Abel, H.J., Irmgard, I., da Costa Gómez, C. & Steinberg, W. (2001). Effect of increasing dietary concentrate levels on microbial biotin metabolism in the artificial rumen simulation system (RUSITEC). *Archiv für Tierernaehrung*, 55(4), 371-376
- Araujo, O. & Vergara-López, J. (2007). Propiedades Físicas y químicas del rumen. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15, 133-140, (Supl.1).
- Barahona, R. & Sánchez, S. (2005). Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6, 69-82.
- Boudry, C. (2003). Interest of *in vitro* predigestion to estimate fermentability of feedstuffs in pig large intestine. En 9th *International Symposium on Digestive Physiology in pigs Banff*. Volumen 2. (pp. 49-51).
- Bernal, L. (2007). *Efecto de las mezclas de las leguminosas Calliandra calothyrsus, Flemingia macrophylla, Cratylia argentea y Vigna unguiculata ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal in vitro y producción de leche en bovinos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 122 p. Recuperado de <https://cgspace.cqjar.org/handle/10568/66186>
- Czerkawski, J.W. & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38, 371-384.
- Calsamiglia, S. & Ferret, A. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. En XVIII *Curso de Especialización FEDNA*, (pp. 97-115). Barcelona, España. Recuperado de www.produccion-animal.com.ar
- Church, D.C. (1974). *Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Díaz, A., Galindo, J.L., Bocourt, R., Silva, M.L. & Pérez, M. (2008). *Los microorganismos del rumen y su papel en la fisiología digestiva del rumiante*. (Monografía). Universidad de Matanzas, Cuba. 25 p.
- Emery, R. S., Smith, C. K., Grimes, R. M., Huffman, C. F., & Duncan, C. W. (1960). Physical and Chemical Changes in Bovine Saliva and Rumen Liquid with Different Hay-grain

- Rations. *Journal of Dairy Science*, 43(1), 76–80. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(60\)90113-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(60)90113-2)
- Fasuyi, A.O., Dairo, F.A.S. & Ibitayo, F.J. (2010). Ensiling wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaves with sugar cane molasses. *Livestock Research for Rural Development*, 22(42). Recuperado de <http://www.lrrd.org/lrrd22/3/fasu22042.htm>. [Consultado: 05 / 02 / 2013].
- Fasuyi, A.O., & Ibitayo, F.J. (2011). Nitrogen balance and morphometric traits of weanling pigs fed graded levels of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaf meal. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition & Development*, 11(3), 1-17.
- García-González, R.R., González, J.S., & López, S.S. (2010). Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum spp.*) and alder buckthorn (*Frangula alnus*). *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3755-3763. doi:10.3168/jds.2010-3107.
- Gómez, M.E., Rodríguez, L., Murgueitio, E., Ríos, C.I., Rosales, M., Molina, C.H., Molina, C.H., Molina, E. & Molina, J.P. (1995). Árboles y Arbustos Forrajeros Utilizados en Alimentación Animal como Fuente Proteica: Mataratón (*Gliríddia septum*), Nacadero (*Trichanthera gigantea*), Pízamo (*Erythrina fusca*) y Botón de oro (*Tithonia diversifolia*). CIPAV. Cali, Colombia. 171p.
- González, B. (1994). Conservación de forrajes y consideraciones técnico-económicas. *Revista De Facultad De Agronomía*, 11(2), 190-206.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E. & Kreuzer, M. (2003). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54(7), 703-713.
- Holguín, V.A., Cuchillo, M. & Martens, S. (2013). *Acidificación de forraje de Tithonia diversifolia para ensilaje mediante inoculación de cepas nativas y aditivos comerciales*. Memorias. ENICIP, Medellín.
- Honig, H., & Woolford, M. K. (1980). Changes in silage on exposure to air. In C. Thomas (Ed.) *Forage Conservation in the 80s*. Trabajo presentado en XI British Grassland Society Occasional Symposium. Hurley, UK.
- Jarrige, R., Ruckbusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H., & Journet, M. (1995). *Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion*. Paris: INRA editions. Recuperado a partir de https://books.google.com.co/books?id=plbmTs7_DDIC
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Ozay, O., Ozkan, C.O. & Sakarya, M. (2004). Chemical composition and *in vitro* gas production characteristics of several tannin containing tree leaves. *LRRD 2004 Livestock Research for Rural Development*, 16(6).

- Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P.A., Weiss, W.P., & Tricarico, J.M. (2014). Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal Dairy Science* 97, 3231-3261
- Koza, G.A., Gimenez, L., Navamuel, J.M., Balbuena, O., Coppo, J.A. 2006. Variaciones en la concentración, familia y género de protozoos ruminales atribuibles a la incorporación de diferentes niveles de semilla de algodón a la ración de novillos. Universidad Nacional del Norte. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. V. 033 4p
- Krause, K.M. & Oetzel, G.R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 215-236.
- La O, O., Valenciaga, D., González, H., Orozco, A., Castillo, Y., Ruíz, O., Gutiérrez, E., Rodríguez, C & Arzola, C. (2009). Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum Purpureum* vc. Cuba CT-115 en la cinética y producción de gas *in vitro*. *Revista Cuba. Ciencia Agrícola*, 43,149-152.
- Lazcano, C. (1996). Oportunidades y retos en la utilización de leguminosas arbustivas como forraje suplementario en sistemas de doble propósito. En Tyrone, Clavero, Cepeda, Maracaibo & Ven (Eds). *Leguminosa forrajeras arbóreas en la producción tropical* (pp. 29-40). Zulia, Venezuela: Centro de transferencia de tecnología en pastos y forrajes de la Universidad de Zulia.
- Lee, M.R.F., Merry, R.J., Davies, D.R., Moorby, J.M., Humphreys, M.O., Theodorou, M.K., MacRae, J.C. & Scolland, N.D. (2003). Effect of increasing availability of water-soluble carbohydrates on *in-vitro* rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 104(1-4), 59-70.
- Lezcano, Y., Soca, M., Sánchez, L.M., Ojeda, F.F., Olivera, Y., Fontes, D., & Santana, H.H. (2012). Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Spanish). *Pastos Y Forrajes*, 35(3), 283-292.
- Machmuller, A. Soliva, C.R. & Kreuzer, M. (2002). *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Canadian Journal of Animal Science*, 82, 233-239.
- Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Ramos, S.S., & Carro, M.D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3684-3698. doi:10.3168/jds.2009-2933
- Mertens, D.R. (1987). Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal Animal Science*, 64(5), 1548-1558.

- McDougall, E.I. (1948). Studies on ruminant saliva I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal*, 43, 99-109.
- Menke, K.H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7-55.
- Merry, R.J., Lee, M.R., Davies, D.R., Dewhurst, R.J., Moorby, J.M., Scollan, N.D. & Theodorou, M.K. (2006). Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. *In vitro* and in vivo studies of nitrogen utilization. *Journal Animal Science*, 84(11), 3049-3060.
- Moore, J.E. (1970). Procedures for the two-stage in vitro digestion of forages. In Harris, L.E. *Nutrition research techniques for domestic and wild animals*, Vol. 1. Logan: Utah State University. 550 p.
- Ogundare, A.O. (2007). Antimicrobial Effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* Leaf Extracts. *Trends in Applied Sciences Research*, 2, 145-150.
- Ojeda, F. (2001). Técnicas de cosecha y ensilaje. En t Mannetje, L. (Ed.). *Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos*. (pp.137-146). Roma: FAO.
- Patra, A.K., & Saxena, J. (2009). The effect and mode of action of Saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22, 204-219. doi:10.1017/S0954422409990163
- Pechin, G.H. (1999). *Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono y los lípidos*. Recuperado de <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n1999a28pechin.pdf> [Consultado en 10-08-2016].
- Pinto-Ruiz, R., Hernández, D., Guevara, F., Gómez, H., Medina, F., Hernández, A., Jiménez, J.A., Alfonso, E., Mendoza, P. & Ruiz, B. (2010). Preferencia de ovinos por el ensilaje de *Pennisetum purpureum* mezclado con arbóreas forrajeras tropicales. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 22, Article #106. Retrieved October 16, 2016, from <http://www.lrrd.org/lrrd22/6/pint22106.htm>
- Roas, M.L., Castillo, C.A. & Tellez, E. (2010). Influencia del tiempo de maduración en la calidad nutricional de ensilajes con forrajes arbóreos. *Rev Sist Prod Agroecol*, 1 (1), 63-73.
- Rojas, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general*. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 155 p.
- Rosales, Méndez, M. (1999). Mezclas de forrajes: Uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. En Rosales, M., Murgueitio, E. & Osorio, H. *Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica* (pp. 201-231). Roma, FAO.

- Rosales, Méndez, M. (2003). Mezclas de forrajes: Uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. En Sánchez, M. & Rosales, M. (Eds.). *Memorias II Conferencia Electrónica de Agroforestería para la Producción Animal*. Roma: FAO, Roma. 345 p.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A. & Givens, D.I. (2005). *In vitro* accumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed and Technology*, 123-124, 9-30.
- Satter, L.D. & Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 32,199-208.
- Tilley, J.M.A. & Terry, R.A. (1963). A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104-111. doi. 10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x
- Tomich, T.R., Gonçalves, L.C., Pinto, R.G., Santos, J.A., Borges, I. & Rodríguez, N.M. (2004). Características Químicas e Digestibilidade *in vitro* de Silagens de Girassol. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(6), 1672-1682, (Supl. 1).
- Van Soest, P.J, Robertson, J.B. & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
- Verdecia, D., Ramírez, J., Leonard, I., Álvarez, Y., Bazán, Y., Bodas, R., Andrés, S., Álvarez, J., Giráldez, F. & López, S. (2011). Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Cauca. *REDVET* 12(5). Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511/051113.pdf>. [Consultado en 08-12-2015]
- Wattiaux, M. (2000). Introduction to Silage-Making. *Dairy Updates*. University of Wisconsin: The Babcock Institute. Feeding No. 502, (p.12). Recuperado de <http://www.dairyweb.ca/Resources/Babcock/Silage.pdf> [Consultado: 05 / 02 / 2013].

8. Ganancia de peso en ovinos alimentados con un ensilaje de *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia*

Vilma Amparo Holguín Castaño¹; Sanín Ortiz Grisales³; María Alexandra Huertas¹; Clemencia Fandiño⁴ y Jairo Mora-Delgado¹

¹ Grupo de Investigación Sistemas Agroforestales Pecuarios, Universidad del Tolima; ² Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia-Palmira; ³ Laboratorio Clínico, Universidad del Tolima

Email: vholquin@ut.edu.co

Resumen

Hoy en día es notable el reconocimiento a los pequeños rumiantes como una opción para la seguridad alimentaria, por lo tanto, se requiere fortalecer programas de investigación tendientes a optimizar las potencialidades productivas de los ovinos mediante sistemas sustentables de alimentación. Se realizó un ensayo para evaluar el efecto de la alimentación con ensilajes de *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia* comparados con un control de *P. purpureum* al 100%. Se emplearon 10 ovinos mestizos de razas tropicales destetados de tres meses de edad y peso promedio de 23 kg, divididos en dos tratamientos: T1 *Pennisetum purpureum* 100% y T2 *Pennisetum purpureum* / *Tithonia diversifolia* en una proporción de 67/33%, respectivamente. Los ensilajes se suministraron como ración base durante 61 días y se suministró un complemento energético de harina de arroz (277g/animal) y sal mineral a voluntad. Se midió peso de los animales al inicio, intermedio y final del experimento. El consumo se midió diariamente en dos suministros a las 7 am y a las 3 pm. Los datos se analizaron en un diseño totalmente al azar con cinco repeticiones; se hizo un análisis de varianza y para la separación de medias se empleó la prueba de Tukey. El consumo promedio durante el periodo experimental fue de 0.59 ± 0.11 y 0.75 ± 0.06 Kg MS/animal/día para T1 y T2, respectivamente. La ganancia diaria de peso

fue positiva con 55 g /animal/día para el tratamiento T2, respecto a una ganancia negativa para T1. Se concluye que la dieta de ensilaje de la mezcla *P. purpureum*/ *T. diversifolia* en ovinos, incrementa el peso corporal a niveles de suplementos de alta calidad proteica.

Palabras clave: Bromatología. Suplemento. Alimentación. Pequeños rumiantes.

Abstract

Today is noticeable the recognition to small ruminants as an important productive option to food sovereignty, thus, it is requiring to strong research programs aimed to optimize the productive potentials of ovine, for improving sustainable feeding systems. An essay was carried out to evaluate the effect of feeding with silage of *Pennisetum purpureum* and *Tithonia diversifolia* in front to *P. purpureum* silage at 100%, as control. A group of 10 tropical cross breed lambs were used with three months of age and average weight of 23kg. Lambs were divided in 2 treatments: T1 *Pennisetum purpureum* 100% and T2 *Pennisetum purpureum* / *Tithonia diversifolia* at 67/33%, respectively. Animals received silage as base ration during 61 days, complementary, barley flour as energetic complement and salt *ad libitum* were offered. Animal weight was measured starting, at middle and ending experiment. Daily intake of silage was measured at two rations, at 7 a.m. and 3 p.m. The experimental design used was a completely randomized design with five repetitions. Data were analyzed through analysis of variance and for the multiple comparison of mean the Tukey test was used. The intake mean were 0.59 ± 0.11 and 0.75 ± 0.06 Kg DM/animal /day on T1 and T2, respectively. Regarding to Weight daily gain, it was positive, with 55 g /animal/day ($P>0.05$) for T2, versus a negative value for T1. It is concluded that silage of *P. purpureum*/ *T. diversifolia* in lambs, increased body weight at levels of supplemental rations of high protein quality.

Keywords: Bromatology. Small ruminants. Feeding. Supplement.

8.1 Introducción

La producción ovina representa una actividad importante en la economía colombiana y comienza a perfilarse como un renglón pecuario de interés para la seguridad alimentaria nacional y regional. Esta actividad, además de proveer productos de consumo directo para

la población humana, genera ingresos económicos para la familia. Los ovinos de pelo juegan un papel muy importante a nivel social para la población rural y comunidades indígenas del país, ellos proporcionan alimento, ofrecen medios para la conservación cultural y de la economía rural, también cuenta con grandes posibilidades para suplir mercados rentables (Arcos Dorado, Romero Huertas, Vanegas Rivera, & Riveros Escobar, 2002).

La cadena de ovinos en Colombia es relativamente joven en comparación con cadenas de más trayectoria institucional, como la de bovinos, porcinos, la de avicultura, entre otras (Osorio, 2012). A raíz del auge del consumo de carne de ovino a nivel Nacional y Mundial y a que hoy día la cadena ovina es considerada a nivel estatal como una de las explotaciones promisorias de desarrollo económico para el país, los productores del sector han impulsado su interés en incrementar la productividad de los sistemas productivos, por tal motivo es importante rescatar las costumbres y saberes de las familias campesinas quienes durante décadas han llevado a cabo esta actividad de manera artesanal extensiva (CORPOICA-SENA, 2009; Arcos et al., 2002).

Es importante tener en cuenta, que el desarrollo tecnológico e industrial del sector en los últimos años se ha enfocado a transformar las explotaciones ovinas artesanales o con baja tecnología que en su gran mayoría son las que hay en Colombia en sistemas de alta incorporación (ASOOVINOS, 2010).

Se necesita desarrollar sistemas de producción basados en estrategias alimentarias que sean adoptadas por los productores para reducir el impacto negativo sobre el ambiente y mejorar la eficiencia de uso de recursos naturales en los sistemas de producción, en aras de reducir el efecto estacional, causante de épocas de escases de forraje, reducir la producción y así contribuir a mejorar el nivel de vida de los productores pecuarios (Mendieta-Araica, 2011) y disminuir la producción de gases de efecto invernadero (Bernal, 2007).

Especialmente en la zona de vida bosque seco tropical, la alimentación de rumiantes presenta serias limitaciones por la escasez de oferta forrajera durante la temporada de sequía (Fujisaka et al., 2005; Holmann, Rivas, Argel, & Pérez, 2004). Además la calidad

de los forrajes se ve afectada por diversos factores como el stress hídrico que incide en el deterioro de las pasturas, por una alta lignificación de las paredes celulares, lo cual incide en la digestibilidad en general y la reducción de la disponibilidad proteica (Rúa, 2007).

De igual forma, la dependencia de un reducido número de especies vegetales, desaprovechando el valor nutritivo de la diversidad de especies presentes en los ecosistemas tropicales y que actualmente están siendo subutilizadas (Rosales Méndez, 1999), despierta el interés por la investigación con especies no convencionales con potencial forrajero y cuya oferta de nutrientes puede diferirse a través del año, especialmente para las épocas de escasas (Holguín, 2005; Wattiaux, 2000).

Para ello, las técnicas de conservación basadas en la fermentación anaeróbica constituyen una estrategia de conservación y optimización de los nutrientes (Gonzales, 1994). Una de estas especies es *Tithonia diversifolia* (TD), la cual ha demostrado versatilidad en el manejo como forraje fresco, pero hay evidencias preliminares que conserva su calidad mediante procesos de ensilado (Fasuyi, Dairo, & Ibitaro, 2010).

Es urgente realizar trabajos de investigación que desarrollen las potencialidades del valor nutritivo y las propiedades de especies forrajeras promisorias, como es el caso de TD, en mezcla ensilada con los forrajes tradicionales usados por los ovinocultores.

El objetivo de este artículo es verificar la bondad de la inclusión de TD en un ensilaje de gramínea midiendo la ganancia de peso de ovinos de pelo

8.2 Materiales y Métodos

El estudio se realizó en la granja experimental Mario González Aranda de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, en el Departamento del Valle del Cauca, sur de Colombia; con una precipitación promedio anual de 1.000 mm, una temperatura promedio de 24°C y una altitud sobre el nivel del mar de 1.000 m ubicada entre los 3°30'29" N y 76° 18' 45" O (Google Earth, 2016). Esta zona está clasificada como bosque seco tropical (Holdridge, 2000). El estudio se realizó durante el periodo comprendido entre el 20 de marzo al 4 de junio del 2016.

El experimento se realizó en un corral con un área de 3.70 x 8.30 metros, dividida en dos áreas, asignando aproximadamente 4 metros para cada tratamiento, los corrales se construyeron en piso plástico y madera (Figura 8-1)

Figura 8-1. Corral de alojamiento de ovinos durante el experimento (Holguín 2016)



Animales y tratamientos. Se utilizaron 10 ovinos de pelo machos enteros, con un peso promedio de 22.6 ± 2.2 kg. El experimento se desarrolló durante 8 semanas, con un periodo de acostumbramiento previo de 15 días para los animales. Estos llegaron a mediados de marzo de 2016 y permanecieron hasta el 4 de junio.

El pesaje de los animales se realizó al inicio, a los 30 días y al finalizar el experimento, todos los pesajes se hicieron a las 7:00 am. El primer pesaje se realizó después de 5 días de acostumbramiento a la dieta de ensilaje y 10 días a los diferentes tratamientos. Tabla 8-1.

Tabla 8-1. Pesajes de los animales antes del periodo experimental para la evaluación de dietas de *Pennisetum purpureum* solo y en mezcla con *Tithonia diversifolia*

Tratamiento	Peso Llegada	Peso acostumbramiento	Peso final del inicio del experimento
T1	23.0±2.03 a	23.0±2.0 a	23.3±1.4 a
T2	22.0±2.40a	23.0±2.4 a	23.6±1.9 a
Total	22.6±2.2 a	23.0±2.0 a	23.5±1.5 a

Valores con letra iguales no tienen diferencia estadística significativa ($p>0.05$). copia personal del autor.

Para los pesajes se utilizó una báscula electrónica marca Crane Scale con capacidad para 300kg. Para determinar la ganancia de peso se estimó la diferencia del peso final menos el inicial y se dividió entre el número de días del período experimental. El suministro de MS se fue ajustando de acuerdo a la etapa de crecimiento de los animales, estimando un promedio de consumo de MS del 3.5% con base al Manual básico de nutrición y alimentación de ganado ovino de Castellaros et al., (2015)

Los animales fueron distribuidos al azar en dos tratamientos:

T1: Ensilaje de *Pennisetum purpureum* + harina de arroz

T2: Ensilaje de *Pennisetum purpureum* (67%) + *Tithonia diversifolia* (33%) + harina de arroz.

La harina de arroz fue suministrada como fuente de energía en igual proporción para ambos tratamientos (277 g/animal) de tal manera que esta no fuese una fuente de variación. La composición de esta fuente fue de 91% de MS; 11.3% de PC; 27.4% de (FDN) y 14.3% de (FDA), según el análisis bromatológico realizado por Díaz (2014)

8.2.1 Elaboración del Ensilaje.

El forraje de *Pennisetum purpureum* y de *Tithonia diversifolia* se cosecho a los 60 y 90 días correspondientemente, además se les hizo un pre secado para bajar el contenido de humedad. Luego, se redujo la partícula a 2 cm. En un molino de tres cuchillas, 7.5 HP, 1400 rpm y 4.5 Amperios Marca Gaitán.

Una vez picado el forraje por separado de las dos plantas, se procedió a mezclar y a asperjar por capas el inóculo de LAB T735, a una concentración de 30×10^7 ufc/ml. Así se preparó 3.3 Ton de *Pennisetum purpureum* y 3.1 t de la mezcla *Tithonia diversifolia/Pennisetum purpureum* (TD/PP) a una proporción de 33% y 67% respectivamente, por ser la proporción más adecuada nutricional y ambientalmente como se demostró en capítulos previos.

El llenado y compactación de las bolsas de los ensilajes se realizó con una máquina compactadora marca INVENTO con un rendimiento de 0.4 Ton/hora. Se utilizó doble bolsa de polietileno negra calibre 7, las cuales fueron almacenadas sobre estibas de madera durante 90 días.

Los ensilajes fueron enriquecidos con un inóculo de *Lactobacillus paracasei* (T735). Las cepas bacterianas usadas como aditivos del ensilaje se produjeron en el Laboratorio Clínico de la Universidad de Tolima con el protocolo siguiente: se tomó una alícuota de 50 g de forraje de (TD), se le añadieron 450 ml de agua de peptona tamponada (1/10). Se realizaron diluciones seriadas (10-2, 10-3, 10-4, 10-7) y se cultivaron en agar MRS. (Placas de Petri) y se incubaron a 37°C durante 72 horas en condiciones anaeróbicas. Se contaron las colonias y luego se aislaron para su posterior uso como inóculo. Los criterios para seleccionar las cepas en el laboratorio se basaron en su capacidad de crecimiento en agar Rogosa y su capacidad para producir ácido láctico (3M Petrifilm™ AC) (Nero et al., 2006).

Además, el kit de prueba de CH API 50 y el medio de API CHL (bioMérieux Vitek Inc.) se utilizaron los 49 hidratos de carbono para determinar las cepas de BAL. Las diluciones del cultivo se cargaron a las franjas de prueba de API 50 CH, siguiendo el protocolo del fabricante. La identificación de especies fue leída en la web de la API de software (BioMérieux Inc).

En la tabla 8-2 puede verse la calidad bromatológica del ensilaje el cual se realizó en el laboratorio de forrajes del CIAT, en el cual se determinó fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), según el método descrito por (Van Soest & Wine, 1967), proteína bruta (PB) según el método de Kjeldahl (Nielsen, 1994) y Materia seca (MS) y cenizas por medio del método de residuo mineral fijo descritos por la (AOAC, 1990)

mediante una estufa (Presition™) a 63°C durante 72 h, con una muestra de 250 g de forraje verde. Luego se procedió a ser suministrado a los animales del experimento.

Tabla 8-2. Análisis bromatológico de las dietas suministradas a los ovinos de pelo

Variable	T1		T2	
	<i>Pennisetum purpureum</i> (100%)		<i>Pennisetum purpureum/Tithonia diversifolia</i> (67%/33%)	
	Media	D.E.	Media	D.E.
MS	% 16.7	0.00a	17.1	0.01a
PC	% 5.55	0.64a	7.80	1.13a
FDN	% 74.05	0.11a	65.09	0.07c
FDA	% 51.02	0.00a	49.92	0.18a
Cenizas	% 12.51	0.01b	10.91	0.07a
DIVMS	% 63.80a		65.83b	

8.2.2 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA con un diseño completamente aleatorizado, con dos tratamientos (T1: ensilaje de *Pennisetum purpureum* al 100% y T2: ensilaje de la mezcla *Pennisetum purpureum/Tithonia diversifolia* al 33 y 67%, respectivamente) con cinco repeticiones por tratamiento. Se empleó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde: Y= variable de respuesta a evaluar en el tratamiento i , repetición j ; T_i = efecto del tratamiento i ; E_{ij} = error experimental

Para la separación de medias se recurrió a la prueba de Tukey y el nivel de significación pre-establecido fue del 5%. Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico Infostat (versión 2016)

8.3 Resultados y Discusión

En la Figura 8-2 A, se presenta el consumo de MS de las dietas, en relación al peso vivo del animal y la parte B, muestra el peso vivo modelado con base a cuatro mediciones desde la llegada de los animales. Hay que tener en cuenta que el periodo experimental comenzó el día 16.

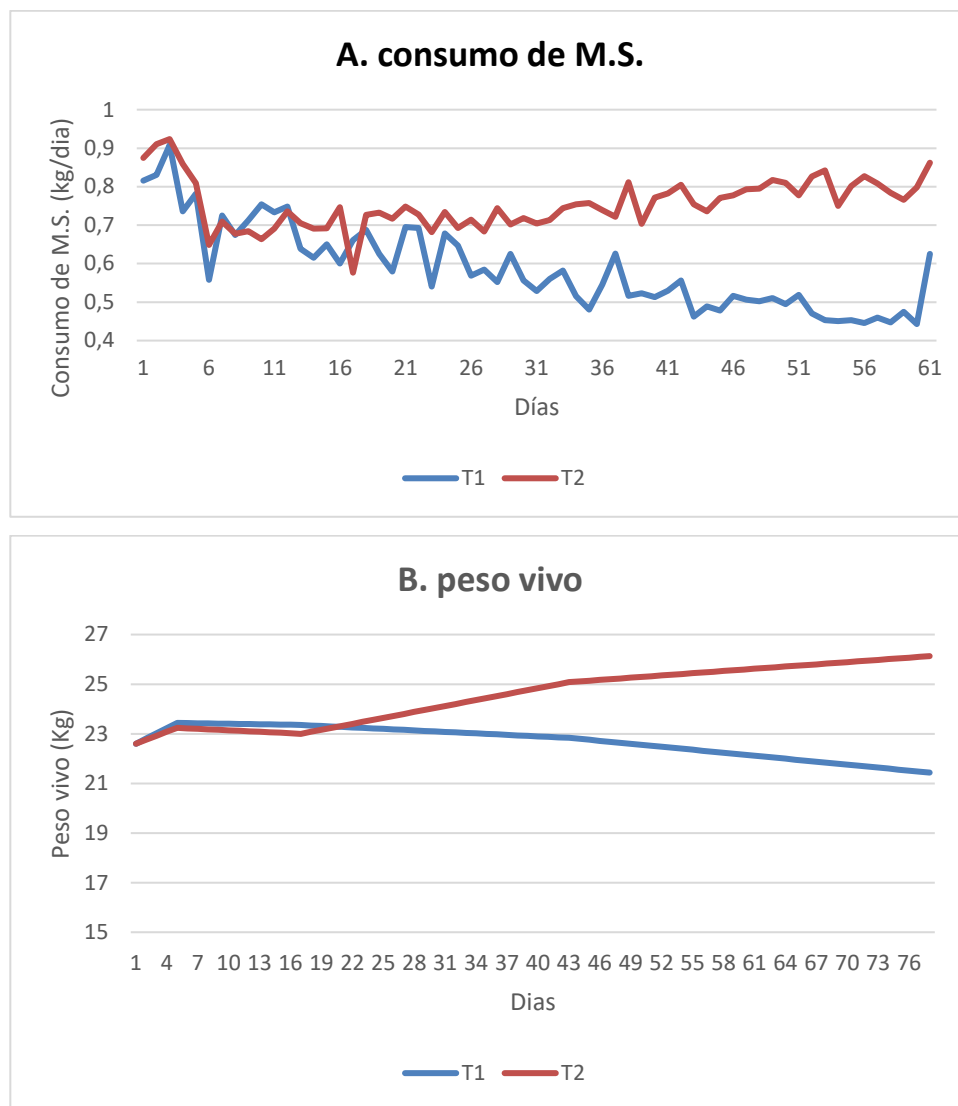
El consumo promedio diario de MS en los animales alimentados con ensilaje de pasto *Pennisetum purpureum* (T1) fue 0.59 ± 0.11 kg y de 0.75 ± 0.06 para los alimentados con ensilaje de *P. purpureum* / *T diversifolia* (T2), con diferencias estadísticas entre éstos ($P < 0.0001$).

Eso significa un consumo real de MS de 2.62% y 2.80% del peso vivo de los animales en la etapa final, lo cual se explica por una mayor cantidad de FDN en la dieta T1, deprimiendo la ingesta. Estos niveles de consumo de MS estuvieron por debajo de los estándares reportados en diferentes estudios: Combellas & Rueda, 1998; Espinoza, Araque, León, Quintana, & Perdomo (2001) reportaron valores entre 3 y 4%; por su parte, Bossiere (1998) y González (1990) registran valores de 5%, para ovinos tropicales.

Posiblemente, el hecho de usar animales que provenían de un plantel en el cual la dieta era a base de pastoreo libre en la mañana y suplementación de harina de cebada explique en parte, la depresión del consumo en el experimento.

Los datos sugieren que el periodo de acostumbramiento debería prolongarse hasta al menos 20 días, dado que las observaciones hechas en la curva de consumo (figura 8-2 A) indica que los primeros seis días de haberse iniciado el periodo experimental, aún se nota una depresión importante del consumo en los dos tratamientos, lo cual podría deberse a una estabilización de la nueva dieta.

Figura 8-2. Consumo de materia seca diaria y peso vivo en ovinos alimentados con *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia*



En la tabla 8-3, se presentan los promedios de pesos iniciales y finales para los dos tratamientos. Se observa que T2 obtuvo el mayor peso, con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre T1 y T2. Este efecto de mayor ganancia de peso se presume sea debido, por una parte, al aporte nutritivo de la dieta con mayor contenido proteico y, por la otra, a la mayor ingesta de MS en T2.

Los valores de ganancia de peso en el periodo evaluado (GPP) acumulados por tratamiento denotan un incremento entre el peso inicial y el peso final de 3.52±1.39 kg/animal para el tratamiento T2 y una pérdida de peso para el T1. La misma respuesta positiva a la ganancia diaria de peso (GDP) se obtuvo en los 61 días evaluados para T2 (0.05 ± 0.02 g). Estos valores resultaron similares a los reportados por (Medina & Sánchez, 2006; Estrada et al., 2002), con valores entre 0.044 y 0.051 Kg/animal/día, con dietas suplementadas con Leucaena y bloques multinutricionales, respectivamente. En el mismo sentido, estos datos son cercanos al estudio de suplementación con fuentes proteicas leñosas (*Guazuma ulmifolia*, *Gliricidia sepium* y *Senna spectabilis*) realizado por (Díaz, 2014) quien obtuvo ganancias diarias de peso de 0.048, 0.049 y 0.053 Kg, respectivamente. Por otra parte, los datos de este estudio fueron superiores a los reportados por (Combellas & Rueda 1998) y (Coronado & Abzueta 2001), entre 12 y 24 g/animal/día, pero fueron inferiores al compararlos con los presentados en estudios suplementados con otras fuentes proteicas, con ganancias entre 0.085 y 0.116 Kg/animal/día (Espinoza et al., 2001; Mendoza et al., 2001 y Clavero et al., 1995).

Tabla 8-3. Parámetros productivos en ovinos de pelo sometidos a dos dietas ensiladas de *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia*

Atributo	T1	T2	p valor
Periodo experimental (días)	61	61	
Consumo alimento (Kg.MS)	19.1±0.90a	22.01±4.15b	0.031
Consumo promedio/día (Kg)	0.59±0.11a	0.75±0.06b	<0.0001
Consumo (gMS/100g de P.V).	2.62	2.80	
Peso inicial (Kg)	23.3±1.4 a	23.6±1.9 a	>0.050
Peso final (Kg)	19.60±3.25 b	27.46±2.82 a	0.040
GPP (Kg)	-2.78±3.77 b	3.52±1.39 a	0.080
GDP (Kg)	-0.06 ± 0.06 b	0.05 ± 0.02 a	0.080
CA	19.41±57.5a	4.28 ± 1.43a	0.450

GPP: ganancia de peso en periodo; GDP: ganancia diaria de peso. CA: conversion alimenticia; T1: *Pennisetum purpureum* (100%); T2 *Pennisetum prurpureum* (67%) + *Tithonia divesifolia* (33%)
Valores con letra diferente tienen diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

Lo anterior se refleja en el indicador de conversión alimenticio (CA), donde los valores sugieren que fue mayor la eficiencia de T2 en el cual solo se requirieron 4.28 kg de MS del ensilaje para producir un kilo de carne, respecto a 19.41 kg de alimento requerido para

producir un kilo de carne en pie en los animales alimentados con una dieta convencional basada solo en pasto.

Al analizar el aporte de proteína en cada tratamiento, se confirman la importancia de incluir un 33% de TD en la dieta, con lo cual se incrementa el aporte diario de PC, en la medida que en T1 se están aportando 20.70 g, mientras que con T2 se aportan 38.49 g. Esto significa un incremento de un 86% en el aporte diario de proteína para el animal.

8.4 Conclusiones

Los datos sugieren una ventaja de la inclusión de *Tithonia diversifolia* en un ensilaje de gramínea, la cual se expresa los valores de ganancia de peso de ovinos de pelo, del T2 respecto al T1. Aunque esta ganancia de peso no es comparable a las obtenidas con alimentación balanceada si sugieren una respuesta positiva a la inclusión de TD

La mejor respuesta animal en ganancia de peso se observó en animales alimentados con ensilaje de *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia* en una proporción de 67% y 33% respectivamente, respecto a la dieta convencional de solo *Pennisetum purpureum*.

Se demostró efecto de la mejor calidad del ensilaje representada en mejores indicadores bromatológicos como un mayor aporte de proteína cruda y valores más bajos de pared celular, lo cual se refleja en una mayor digestibilidad de la MS.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira por facilitar los espacios para el experimento (al Sr Jairo Soto y Don Ángel, por su apoyo incondicional); al CIAT por permitir el uso de equipos y análisis de laboratorio y a la Oficina Central de Investigaciones y Desarrollo científico de la Universidad del Tolima, por el financiamiento de este estudio.

8.5 Referencias

Arcos Dorado, J. A., Romero Huertas, H., Vanegas Rivera, M. A., & Riveros Escobar, E. (2002). *Ovinos colombianos de pelo: alternativa productiva para el sur del departamento del Tolima*. Bucaramanga: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Recuperado a partir de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/3867>

- Asociación de Criadores de Ganado Ovino de Colombia. (2010). *Plan estratégico para el desarrollo gremial 2010 - 2018* "La ganadería ovina en procura de su desarrollo". Bogotá D.C.: Colombia editores.
- Association of Official Analytical Chemists. (1990). *Official Methods of Analysis*. Washington, D.C.
- Bernal, L. (2007). *Efecto de las mezclas de las leguminosas Calliandra calothyrsus, Flemingia macrophylla, Cratylia argentea y Vigna unguiculata ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal in vitro y producción de leche en bovinos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 122 p. Recuperado de <https://cgspace.cqjar.org/handle/10568/66186>
- Bossiere, J. (1998). *Pasto de corte en la alimentación de caprinos en sistemas intensivos de crianza*. Curso "Producción de ovinos y caprinos" Fonaiap. CIAE-Lara.
- Castellaro, G. Orellana, C. Escanilla, J.P. (2015). *Manual básico de nutrición y alimentación de ganado ovino*. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Recuperado de <http://ficovino.agronomia.uchile.cl/wp-content/uploads/2016/01/Manual-B%C3%A1sico-de-Nutrici%C3%B3n-y-Alimentaci%C3%B3n-Ovina.pdf>
- Clavero, T., Muller A. & Razz R. (1995). Comportamiento de ovinos suplementados con *Leucaena leucocephala*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 15: 413-414.
- Combellas, J. (1997). *Producción de Ovinos en Venezuela*. Fundación Polar. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela: Editorial Arte.
- Combellas, J., & Rueda, E. (1998). Evaluación de la suplementación con bloques multinutricionales en corderos. En *Memorias II Congreso Nacional de Ovinos y Caprinos*. Maturín. Venezuela.
- Coronado, L., & Abzueta, J. (2001). Evaluación de corderos en crecimiento a pastoreo, suplementados con diferentes fuentes proteicas. En *Memorias III Congreso Nacional y I Internacional de Ovinos y Caprinos*. Maracay: Universidad Central de Venezuela.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Sena. (2009). *Orientaciones técnicas para el mejoramiento genético y el manejo reproductivo de la ovinocultura del Tolima*. Edición Comité de Ganaderos del Tolima, Espinal.
- Díaz, V. (2014). *Evaluación de cuatro especies arbóreas del bosque seco tropical en dietas para ovinos de pelo colombiano y su efecto en la producción, calidad de carne y análisis económico*. Ibagué: Universidad del Tolima.
- Espinoza, F., Araque, C., León, L., Quintana, H., & Perdomo, E. (2001). Efecto del banco de proteína sobre la utilización del pasto estrella (*Cynodon lempuensis*) en pastoreo con ovinos. *Zootecnia Tropical*, 19(3), 307–318. Recuperado a partir de <http://www.bioline.org.br/request?zt01038>

-
- Estrada, D., Arévalo E. y Baldizan, A. (2002). Suplementación con bloques multinutricionales en la alimentación de corderos mestizos West-African y Bergamasca. En *Memorias XI Congreso Nacional de Producción e Industria Animal*. Asoc. Ven. Producción Animal. Valera, Estado Trujillo. Venezuela.
- Fasuyi, A.O., Dairo, F.A.S., & Ibitaro, F.J. (2010). Ensiling wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaves with sugar cane molasses. *Livestock Research for Rural Development*, 22(3). Recuperado a partir de <http://www.lrrd.org/lrrd22/3/fasu22042.htm> . [Consultado: 05 / 02 / 2013].
- Fujisaka, S., Holmann, F.J., Peters, M., Schmidt, A., White, D., Burgos, C., Davis, C. (2005). Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua Introducción. *Pasturas Tropicales*, 12(2), 73–92. Recuperado a partir de <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/pages/view/Pasturas>
- González, B. (1994). Conservación de forrajes y consideraciones técnico-económicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 11(2), 190–205. Recuperado a partir de <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/11525/11515>
- González, W. (1990). *Alimentación Animal*. Caracas, Venezuela: Editorial América
- Holdridge, L.R. (2000). *Ecología basada en zonas de vida*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Holguin Castaño, V.A. (2005). *Análisis comparativo y evaluación financiera de modelos de manejo nutricional en fincas de ganado de doble propósito en la zona del Pacífico Central de Costa Rica* (Tesis Magister). Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica.
- Holmann, F., Rivas, L., Argel, P., & Pérez, E. (2004). Impacto de la adopción de pastos Brachiaria: Centroamérica y México (*Documento de Trabajo No. 197*). Palmira: CIAT/ ILRI. Recuperado a partir de <http://hdl.handle.net/10568/2212>
- Medina, R., & Sánchez, A. (2006). Efecto de la suplementación con follaje de *Leucaena leucocephala* sobre la ganancia de peso de ovinos desparasitados y no desparasitados contra estrongídeos digestivos. *Zootecnia Tropical*, 24(1), 55–68. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692006000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Mendieta-Araica, B. (2011). *Moringa oleifera as an Alternative Fodder for Dairy Cows in Nicaragua*. (Tesis de Doctorado), Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- Mendoza A., J. Michailos y J. de Combellas. (2001). Uso de *Leucaena* en dietas completas para corderos en crecimiento. En *Memorias III Congreso Nacional y I Internacional de Ovinos y Caprinos*. Maracay. Universidad Central de Venezuela.

- Nero, L.A., Beloti, V., Aguilar Ferreira Barros, M. de, Tassinari Ortolani, M.B., Tamanni, R., & De Melo Franco, B.D.G. (2006). Comparison of Petrifilm aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 14(3), 249–257. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2006.00050.x>
- Nielsen, S. (1994). *Introduction to the Chemical Analysis of foods*. Ed. Jones and Bartlett Publishers. U.S.A. pp: 209-212.
- Osorio Moreno, K.A. (2012). *Plan de negocios para una empresa comercializadora de carnes tradicionales y exóticas la Carbiferia*. (Tesis de pregrado). Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado a partir de <http://hdl.handle.net/10554/10696>
- Rosales Méndez, M. (1999). Mezclas de forrajes: uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. En *Agroforestería para la producción animal en América Latina* (pp. 201–231). Roma: FAO.
- Rúa, M. (2007). *Manual ilustrado de confinamiento bovino*. Cultura Empresarial Ganadera.
- Van Soest P J & Wine R H. (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 50(1):50-5.
- Wattiaux, M. (2000). *Nutrientes en la dieta*. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional para la Industria Lechera. Wisconsin, USA.

9. Conclusiones Generales

Esta tesis sugiere un potencial valor nutricional del ensilaje de *Tithonia diversifolia* en mezcla con *Pennisetum purpureum* para optimizar su desempeño como alimento para ovinos de pelo. Para llegar a esta verificación se probaron las hipótesis propuestas: la primera de ellas verificó el desempeño productivo y valor nutricional de *T. diversifolia*, seleccionando las accesiones con mayor valor forrajero y de productividad.

Las introducciones de TD de mayor producción forrajera fueron agrupadas en el conglomerado 1. En este conglomerado, los materiales analizados se destacan por la alta productividad de forraje, presentando como características sobresalientes la elevada tasa de crecimiento, el número de ramas por sitio y la productividad por hectárea. Este grupo contrastó de manera relevante con las introducciones del Conglomerado 2 que se destacaron en la relación H:T y por un mayor peso de las hojas, variable que puede ser un indicador de calidad de forraje.

La caracterización cuantitativa permitió avanzar en el conocimiento de la variabilidad dentro de la especie, en cuanto a producción de forraje, y el análisis multivariado facilitó la discriminación entre introducciones, con base a rasgos que normalmente pasan desapercibidos y que se expresan de manera diferente en diversidad de ambientes. La evaluación integral mediante el IRCEP permitió identificar las cuatro introducciones más promisorias en términos de productividad y calidad.

Un índice compuesto como el IRCEP constituye una herramienta de utilidad en la toma de decisiones con criterios múltiples, pues cuando se clasifican las introducciones con base a indicadores de cantidad o calidad de manera independiente, los resultados son diferentes a los de un índice que integra múltiples criterios. Cabe resaltar, sin embargo, que hay indicadores que pueden tener una mayor relevancia en el análisis de las variables. Las

introducciones promisorias, determinadas por el IRCEP, son las que presentan menores contenidos de FDA y pared celular. A diferencia de la PC que es un indicador de calidad de un forraje, pero que no necesariamente coincide con un buen VRF bajo, en virtud de que este está condicionado a los contenidos de FDN y FDA.

Un indicador importante en la descripción de características físicas de las plantas es el área foliar. Las ecuaciones que relacionan el área de la hoja con la longitud, ancho y el producto de estas dos variables ($L * A$) son los que exigen menos esfuerzo y tiempo en la medición en el campo, porque sólo se miden dos dimensiones fácilmente en el campo. En este estudio, una ecuación alométrica fue desarrollada para predecir el área foliar de *T. diversifolia* ($y = 0.755 + 0.438 (W*L)$). Este modelo se eligió por su simplicidad y capacidad de producir resultados con el mismo nivel de precisión que otras más complejas. Así, el uso de esta ecuación permitirá a los investigadores realizar mediciones no destructivas o repetidas de las plantas.

Por otra parte, se verificó la presencia de cepas nativas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de forraje de *T. diversifolia*, con lo cual se demuestren eficiencia acidificadora comparada con aditivos comerciales y las cepas aisladas. Esto dio pie para confirmar la ensilabilidad de TD, además de su papel como fuente de proteínas, mientras que PP como la fuente de fibra. Sin embargo, la relación de WSC/BC confirmó la mayor aptitud para el ensilaje de PP, lo cual se deriva de su baja capacidad buffer. Por el contrario, la alta capacidad buffer de TD limita su aptitud para el ensilaje. Los datos experimentales sugieren que la acidificación del medio es más rápida en tanto la proporción de la gramínea aumenta.

Eso significa que la presencia de bacterias epifitas de *Lactobacillus paracassei* presentes en el inoculo T735 pueden mejorar la fermentación láctica y propiciar la caída del pH en una mezcla de TD/PP. El mejor potencial acidificador de esta BAL se expresó a las 20 horas y se mantiene después de 48h. No obstante, es importante mencionar que una mayor proporción de la gramínea en la mezcla contribuye significativamente a la ensilabilidad, en la medida que el medio se acidifica y baja el pH hasta niveles apropiados ($pH < 4$) para reducir la acción de microorganismos patógenos y la reducción de la proteólisis por la acción enzimática y la hidrólisis química.

Los ensilajes de la mezcla (TD/PP) fueron aeróbicamente estables; aunque se observó presencia de microorganismos causantes de deterioro como mohos y levaduras, su presencia no fue significativa.

La variación de la temperatura en el PEA no sobrepasó los 3°C por más de tres días lo cual ratifica la estabilidad aeróbica del ensilaje. Se presentó un ligero incremento de la MS después de la PEA, posiblemente como respuesta a la pérdida de humedad sucedida en la exposición al efecto desecante del aire. Sin embargo, la diferencia en el valor de MS de los cuatro tratamientos no mostró diferencias significativas. En esta mezcla, el papel de *T. diversifolia* es notorio una vez que los silos en el periodo de exposición aeróbica, en la medida que su mayor capacidad buffer tiene un mayor efecto en amortiguar el cambio de pH una vez que el silo es abierto. Así, la mayor estabilidad al efecto de la fermentación aeróbica, se da en los ensilajes con mayor proporción de TD (T1 y T2) respecto a los que tienen mayor proporción de PP (T3 y T4).

Por otra parte, en la evaluación *in vitro* de la cinética ruminal los tratamientos con una alta proporción de *T. diversifolia* fueron los que presentaron una mayor degradación de la MS y más ecoamigables, en virtud de que presentaron los valores más bajos de producción de gas, mientras que los tratamientos con mayor inclusión de gramínea producen más gas, especialmente CH₄. Los datos demuestran que el ensilaje de solo gramínea (T4) emite la mayor cantidad de CH₄, pero esta puede disminuir a medida que aumenta la inclusión de TD, de echo los ensilajes de solo TD emitieron significativamente menos CH₄ que los que contenían PP.

El análisis de la cinética ruminal simulada en un RUSITEC permitió confirmar que la simulación evidencia parametros semejantes a los que podrían encontrarse en el rumen. Las características del líquido ruminal aislado durante la evaluación de las dietas, se mantuvo en los niveles adecuados del rumen. Se presentó un ligero aumento en el pH respecto a la acidez normal del rumen (7.3 y 7.4), sin embargo, entre tratamientos no hubo variación significativa. El potencial redox no presento diferencias significativas entre tratamientos. El nitrógeno amoniacal, fue más bajo en los tratamientos que incluyeron TD. Los ensilajes que incorporaron *T. diversifolia* presentaron la menor cantidad de CH₄ emitido. Esta reducción, podría traducirse en condiciones prácticas, en una reducción de CH₄ emitido por unidad de proteína animal producida que sería útil aun cuando la cantidad

total de CH₄ emitido no disminuya. El RUSITEC, confirmo la mejor respuesta de la mezcla ensilada de TD /PP en proporción de 33% y 67% respectivamente, dado que el efecto entre tratamientos, aunque fue significativo ($p = 0.4875$) sugiere que T1 aumento el drenaje de acetato respecto a los tratamientos que incorporan TD. La misma tendencia se presentó en el drenaje de propionato, aunque sin diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p = 0.3525$). En el caso del butirato, sí presento diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$), siendo notoria la mayor producción de este ácido en el control (T1) y más bajo en los tratamientos que incorporan TD. Eso significa que las dietas de solo gramíneas conducen a una alta segregación de butirato, perdiendo carbonos en forma de CH₄. En el RUSITEC, se confirman los datos antes mencionados que en mezclas de forraje (TD/PP) se encontró una producción descendente del CH₄ a medida que se incrementa la inclusión de TD.

Finalmente, se confirma la hipótesis sobre la respuesta biológica de ovinos de pelo alimentados con ensilado de *T. diversifolia* solo o en mezclas con gramíneas fibrosas, sugiriendo la factibilidad de incorporarla en la dieta para rumiantes. La mejor respuesta animal en ganancia de peso se observó en animales alimentados con ensilaje de *P. purpureum* y *T. diversifolia* en una proporción de 67% y 33% respectivamente, respecto a la dieta convencional de solo *P. purpureum*. La ganancia de peso positiva con 55 g/animal/día para el tratamiento T2, respecto a una ganancia negativa para T1, confirman la ventaja de la mezcla ensilada, respecto a sistemas convencionales de alimentación basados solo en gramíneas.