



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA**

**CENTRO DE POSGRADOS MAESTRÍA EN NUTRICIÓN Y
PRODUCCIÓN ANIMAL**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE MAGÍSTER EN: NUTRICIÓN Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

**TEMA: CINÉTICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE
GAS IN VITRO DEL PASTO KING GRASS (*Pennisetum purpureum* x
Pennisetum typhoides) ASOCIADO A VARIOS NIVELES DE MATA RATON
(*Gliricidia sepium jacq.*)**

AUTOR: TOBAR GALVEZ, JUAN PABLO

DIRECTOR: ING. PH.D. AVELLANEDA CEVALLOS, JUAN HUMBERTO

SANGOLQUI

2018



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
TECNOLOGÍA**

CENTRO DE POSGRADOS

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “CINETICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE GAS IN VITRO DEL PASTO KING GRASS (Pennisetum purpureum x Pennisetum typhoides) ASOCIADO A VARIOS NIVELES DE MATA RATON (Gliricidia sepium jacq)” fue realizado por los señor Tobar Gálvez, Juan Pablo, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de Julio del 2018

.....
Mag. Avellaneda Cevallos, Juan Humberto

C.C.: 120297771-4



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

AUTORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Tobar Gálvez, Juan Pablo con cédula de ciudadanía n°: 171210421-3, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “CINETICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE GAS IN VITRO DEL PASTO KING GRASS (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*) ASOCIADO A VARIOS NIVELES DE MATA RATON (*Gliricidia sepium jacq*)” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 06 de Julio del 2018

Tobar Gálvez, Juan Pablo

C.I. 171210421-3



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE
TECNOLOGÍA**

CENTRO DE POSGRADOS

AUTORIZACIÓN

Yo, Tobar Gálvez, Juan Pablo con cédula de ciudadanía n°: 171210421-3, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “CINETICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE GAS IN VITRO DEL PASTO KING GRASS (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*) ASOCIADO A VARIOS NIVELES DE MATA RATON (*Gliricidia sepium* jacq)” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Sangolquí. 06 de Julio del 2018

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Ing. Juan Pablo Tobar Gálvez'. Below the signature, there are two horizontal lines, one above and one below the signature, which are also drawn in blue ink.

Tobar Gálvez, Juan Pablo

C.I. 171210421-3

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza para luchar en la adversidad y cubrirme con sus bendiciones. A mi madre quien con su sabiduría, consejos y apoyo supo darme la fuerza para salir adelante en la elaboración de esta investigación. A mis hijos que ha sabido soportar mi ausencia en momentos especiales para ellos. A mi esposa Esperanza una mujer extraordinaria que comparte su vida conmigo, me ha brindado su tiempo, apoyo y amor en todo instante. Para ustedes quienes me ayudaron a lograr este objetivo. Los amo con todo mí ser.

Tobar Gálvez, Juan Pablo

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso, por darme la vida y llenarla de bendiciones.

Un especial agradecimiento a mi querida madre quien fue el sostén anímico que me ayudó a continuar en este arduo camino y llegar hasta este gran logro.

A mis hermanos e hijos, por el apoyo y ayuda incondicional a lo largo de toda esta nueva etapa de mi vida.

A mi esposa por toda su ayuda, apoyo, compañía y consejos para terminar este proyecto.

A quienes me ayudaron a conseguir este logro: Ing. Juan Avellaneda, Ing. Mario Ortiz, por su sabiduría, apoyo, tiempo, paciencia y consejos; un agradecimiento especial por su contribución para la elaboración de este proyecto.

A las personas que de alguna u otra manera apoyaron la ejecución de esta investigación.

Tobar Gálvez, Juan Pablo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORIA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO I	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo General	2
1.2.2. Objetivos Específicos	2
1.3. Hipótesis	3
CAPITULO II	4
REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Pasto King Grass (<i>Pennisetum purpureum</i> x <i>Pennisetum typhoides</i>)	4
2.2. Mata ratón	5
2.2.1. Usos	5
2.3. Razones para estudiar la digestibilidad	7
2.3.1. Método "in vitro"	8
CAPITULO III	13
MATERIALES Y METODOS	13
3.1. Localización geográfica	13

3.2. Condiciones Agro meteorológicas	13
3.3. Materiales y equipos.....	13
3.3.1. Material de laboratorio	13
3.3.2. Equipo de laboratorio	14
3.3.3. Reactivos y soluciones de laboratorio	15
3.4. Métodos.....	16
3.4.1. Diseño Experimental.....	16
3.4.2. Factor en estudio.....	16
3.4.3. Tratamientos	16
3.4.4. Unidad Experimental.....	17
3.4.5. Análisis Estadístico	17
3.4.6. Variables en estudio	17
3.4.7. Procedimientos Experimentales (Protocolo).....	17
3.4.7.1. Incubaciones In Vitro.....	17
3.4.8. Determinación de la degradabilidad ruminal.	18
3.4.8.1. Degradabilidad de materia seca (MS) y orgánica (MO).....	18
3.4.8.2. Degradabilidad de fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA).	19
3.4.8.3. Digestibilidad de la fibra detergente neutra (FDN)	19
3.4.8.3.1. Preparación de la muestra.....	19
3.4.8.3.2. Procedimiento.....	20
3.4.8.3.3. Cálculos..	21
3.4.8.4. Digestibilidad de la fibra detergente ácida (FDA)	21
3.4.8.4.1.Preparación de la solución detergente ácida	21
3.4.8.4.2. Cálculos..	22
CAPITULO IV	24
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	24
4.1. Degradabilidad <i>in vitro</i> de materia seca (MS).....	24
4.1.1. Degradabilidad in vitro de Materia Orgánica (MO).....	28
4.1.2. Degradabilidad in vitro de materia inorgánica (MI).....	31

4.1.3. Degradabilidad in vitro de las fracciones fibrosas de la pared celular (fibra en detergente neutro-DIVFDN y fibra en detergente ácida-DIVFDA)	33
CAPITULO V	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1. Conclusiones.....	39
5.2. Recomendaciones	40
BIBLIOGRAFIA.....	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Materia Seca (MS) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mataratón.....</i>	<i>25</i>
Tabla 2 <i>Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Materia Orgánica (MO) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón</i>	<i>29</i>
Tabla 3 <i>Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Materia Inorgánica (MI) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón</i>	<i>32</i>
Tabla 4 <i>Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Fibra Detergente Neutra (FDN) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón</i>	<i>34</i>
Tabla 5 <i>Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Fibra Detergente Ácida (FDA) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón.</i>	<i>36</i>

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> Cambios de la degradabilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) del	26
<i>Figura 2</i> Cambios de la degradabilidad in vitro de la materia orgánica (DIVMO)	30
<i>Figura 3</i> Cambios de la degradabilidad in vitro de la materia inorgánica	33
<i>Figura 4</i> Cambios de la degradabilidad in vitro de la fibra detergente neutro	35
<i>Figura 5</i> Cambios de la degradabilidad in vitro de la fibra detergente ácido	37

RESUMEN

Se determinó la digestibilidad *in vitro* (DIV) de materia seca (DIVMS), orgánica (DIVMO), inorgánica (DIVMI) y de las fracciones de la pared celular (DIVFDN y DIVFDA), y los parámetros de degradabilidad (a, b y kd) del pasto King grass asociado a 10, 20, 30 y 40% de mata ratón. Se empleó la técnica de digestibilidad *in vitro* Tilley y Terry. Se evaluaron seis tratamientos y cinco repeticiones. Se utilizó un diseño completamente al azar y para la comparación la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. La DIVMS y DIVMO se mejoró numéricamente con la adición de hasta 40% de la forrajera, sin embargo, no hubo cambios en la DIVMI. El Mata ratón empleado como 100% de la dieta, presentó la menor DIV de MS, MO, MI, y FDN. La fracción soluble (a) de la MS presentó el menor valor con la adición de 40% de Mata ratón. El Mata ratón no provocó cambios en la fracción soluble (a) de la MO. El mayor valor de fracción soluble (a) de la MI, se presentó en el tratamiento con el 20% de adición. La menor fracción soluble (a) de la FDN se evidenció con el empleo del 20 y 40% de Mata ratón. La menor fracción soluble (a) de la FDA se evidenció con el empleo del 20%. No se evidenció efectos lineales de la inclusión de Mata ratón sobre de la fracción potencialmente degradable (b), tasa de degradabilidad (kd) y degradación efectiva del pasto King grass.

PALABRAS CLAVE:

- **DEGRADABILIDAD**
- **IN VITRO**
- **MATERIA SECA**
- **FIBRA DETRGENTE NEUTRA**
- **FIBRA DETERGENTE ACIDA**

ABSTRACT

It has been determined In Vitro Dry Matter Digestibility (IVDMD), In Vitro Organic Matter Digestibility of (IVOMD), In Vitro Inorganic Matter Digestibility of (IVIMD) and cell wall fractions (DIVFDN and DIVFDA), and degradability parameters (a, b and kd) of King Grass associated to 10,20,30 and 40% of gliricidia. For the first phase of the In Vitro Digestibility technique, Gliricidia sepium, Tilley and Terry were used. Six treatments and five replications were evaluated. The test was run under the completely randomized design and for means of comparison, the Tukey test was used with 5% probability. IVDMD and IVOMD were increased numerically with the addition of up to 40% of the forage; however, there were no changes in IVIMD. The Gliricidia sepium used was 100% of the diet and presented the lowest IVD of MS, MO, MI and NDF. The soluble fraction (a) of MS presented the lowest value with the addition of 40% Gliricidia sepium killer. The gliricidia ketone did not cause changes in the soluble fraction (a) of MO. MI provided the highest value of the soluble fraction (a) with 20%. The lowest soluble fraction (a) was witnessed with NDF with the use of 20% and 40% gliricidia, with 20% of NDF being evidenced as the lowest soluble fraction. No linear effects with the inclusion of gliricidia on the potentially degradable fraction (b), rate of degradability (kd) and effective of King Grass were evidenced.

KEYWORDS:

- **DEGRADABILIDAD**
- **IN VITRO**
- **DRY MATTER**
- **NEUTRAL DETERGENT FIBER**
- **ACIDIC DETERGENT FIBER**

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Antecedentes

La producción de leche y el crecimiento de los rumiantes son limitados por la calidad del forraje, lo cual se refleja principalmente en el bajo consumo voluntario y baja digestibilidad. Por lo tanto, métodos precisos y prácticos para la evaluación del valor nutricional de los forrajes son de reconocida importancia. Ya que, los programas de evaluación de dietas (Fox, Sniffen, O'Connor, Russell, & Van Soest, 1992) requieren información detallada de la cinética de digestión de los diferentes pastos y forrajes con los que se alimenta a los bovinos. Expresiones cuantitativas de la cinética de digestión son necesarias para estimar de una forma más precisa la cantidad de nutrientes digeridos desde los pastos y las propiedades intrínsecas de éstos que limitan su disponibilidad para los rumiantes. (López, Carro, González, & Ovejero, 1998)

Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Debido a que en los estudios *in vivo*, los alimentos sólo pueden ser evaluados en raciones totales y al hecho de que tales estudios requieren considerables recursos son difíciles de estandarizar; lo que hace necesario el empleo de varias técnicas *in situ* e *in vitro*. Dentro de las técnicas *in vitro*, la de uso más frecuente es la descrita por Tilley y Terry (1963) la cual fue modificada por Goering y Van Soest (1970) para estimar la digestibilidad verdadera de la materia seca (MS). Otra técnica *in vitro* consiste en la utilización de enzimas en lugar de microorganismos, cuya principal ventaja es que no requiere animales como donadores de inóculo. (Beuvind & Spoeltra, 1994)

Sin embargo, la técnica de la bolsa de nylon proporciona la posibilidad de estimar la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes del alimento; sin embargo, es una aproximación laboriosa, costosa e invasiva, en la que solamente un pequeño número de muestras pueden ser evaluadas al mismo tiempo. (Theodorou, Williams, Dhanoa, McAllan, & France, 1994)

Esta técnica en los últimos años está siendo reemplazada por el digestor Daisy, este aparato permite estudiar la cinética *in vitro*, o calcular la desaparición de la MS a un tiempo fijo, otra ventaja al utilizar este incubador es que a diferencia de la técnica Tilley y Terry (1963) en el digestor podemos variar tiempo de incubación y presentar información de digestibilidad verdadera y aparente a tiempos de incubación de 24, 30 o 48 h. (Di Marco, 2011)

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar la degradación ruminal *in vitro* del pasto King grass (*Pennisetum purpureum x Pennisetum typhoides*) asociado a varios niveles de Mata ratón (*Gliricidia sepium jacq.*)

1.2.2. Objetivos Específicos

Evaluar la degradación del pasto King grass (*Pennisetum purpureum x Pennisetum typhoides*) asociado a 0, 10, 20, 30% de Mata ratón (*Gliricidia sepium jacq.*)

Determinar la degradabilidad de Materia Seca, Fibra Detergente Neutra y Acida de las mezclas forrajeras a estudiar.

1.3. Hipótesis

H₀ = La degradación de la mezcla forrajera a través del proceso fermentativo no mejora cuando se incrementa el nivel de Mata ratón (*Gliricidia sepium jacq.*)

H_a = La degradación de la mezcla forrajera a través del proceso fermentativo mejora con el mayor nivel de Mata ratón (*Gliricidia sepium jacq.*)

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Pasto King Grass (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*)

Es un pasto originario de África del sur, introducido en América en 1974. Fue obtenido por el cruzamiento de *Pennisetum purpureum* y *Pennisetum typhoides*. Es una especie que crece en matojos y produce numerosos tallos por planta, los cuales pueden alcanzar alturas hasta de 3.5 m y un diámetro entre 13 y 15 milímetros. Posee hojas anchas largas con vellosidades suaves y cortas, la inflorescencia presenta las características típicas del género *Pennisetum* con semillas sexuales fértiles, hasta con 18% de germinación. La cosecha se la realiza cada 45 días, cuando ha alcanzado entre 1.5 y 1.8 metros de altura. Con condiciones favorables de manejo, en climas cálidos se producen entre 50 y 60 mil kilogramos de forraje verde por hectárea. Es la especie de corte más empleada, se utiliza para suministrarlo picado verde al ganado o para ensilar. También es una gramínea perenne, reconocida como la forrajera de mayor tamaño y producción en el trópico. Se debe usar sólo para corte, pudiéndose suministrar al ganado como heno, ensilaje o en forma verde, recomiendan que, para un mejor aprovechamiento del pasto, se corte las plantas cada 65 a 75 días ya que en estas condiciones están jugosas y tiernas. (Guerrero, 2012)

En cuanto a la descripción morfológica de la especie forrajera manifiesta que el uso principal de esta gramínea tropical es para la producción de forraje de corte, que tiene un crecimiento erecto y que puede medir hasta tres metros de altura, el tallo es similar a la caña de azúcar, que puede alcanzar entre 13 y 15 cm de diámetro, siendo flexible cuando está tierno; las hojas son anchas y largas con vellosidades suaves y no muy largas, variando desde un color claro cuando jóvenes hasta

verde oscuro cuando están maduras. Otra de las características importantes de su adaptación a ambientes tropicales, es su tolerancia a enfermedades y plagas por tratarse de una planta muy rústica, se ha encontrado hasta ahora un ligero ataque de manchas en las hojas causada por el hongo *Drechslera sp.*, en Santander de Colombia, el cual no afectó mayormente los rendimientos del cultivo. También se han reportado observaciones de bacteriosis en el crecimiento de los tallos recién cortados de la planta y ligeros ataques de “mion” o “Salivazo”, en las mismas condiciones, pero sin mayores consecuencias. (Tituaña, 2012)

2.2. Mata ratón

Gliricidia sepium (Jacq.) Walp., conocido comúnmente como *gliricidia*, madre de cacao, mata-ratón, madero negro y *mother of cocoa* (en inglés), es un árbol caducifolio de tamaño pequeño o mediano y sin espinas, con un tronco corto y una copa esparcida e irregular. La madre de cacao, nativo de México y América Central, ha sido cultivado extensamente en regiones tropicales y subtropicales fuera de su área de distribución natural para ser usado como una cerca viviente; para la producción de maderos pequeños, leña y forraje, y como un árbol de sombra y poste viviente para hortalizas en sistemas agroforestales. (Gómez, y otros, 2002)

2.2.1. Usos

La madre de cacao se cultiva a menudo como una cerca viviente, y los vástagos se cortan a intervalos frecuentes para ser usados como fertilizante orgánico (Yamoah, *et al.*, 1987), forraje para el ganado y como combustible. Las hojas son usadas como forraje para rumiantes pequeños y grandes tienen un contenido crudo promedio de proteína y de lignina y una digestibilidad *in vitro* de la materia seca del 19 al 30 por ciento, 9.14 por ciento, y del 48 al 75 por ciento, respectivamente.

El alimento obtenido de las hojas es un aditivo útil en las dietas para gallinas ponedoras. Su uso como forraje para ganado es debatible; a pesar de que tiene un alto contenido nutricional, se han reportado problemas con el sabor y la toxicidad. (Adejumo & Ademosun, 1985)

La madre de cacao se ha usado también en barreras contra incendios y como rompe vientos, y para la reforestación de cuencas desnudas. Se cultiva extensamente en sistemas agroforestales como un árbol de sombra para café, té y cacao; como un soporte para la vainilla y enredaderas de pimientos, y como una siembra del estrato inferior en plantaciones de coco. Su uso como árbol de sombra para el cacao parece haberse originado entre los aztecas en México, para los cuales el árbol se conocía como “cacahuanatl” o madre de cacao. En Las Filipinas, las ramas de madre de cacao se esparcen sobre las siembras de arroz, en donde ayudan a repeler las plagas del arroz, tales como el gusano *Nymphula* sp. y la larva del díptero *Hydrellia* sp. Se ha reportado que el usar madre de cacao como un fertilizante orgánico en suelos inundados y contaminados con DDT acelera la decloración reductiva del pesticida sin propiciar la formación de productos secundarios tóxicos. (Kunth, 1842)

La albura es de un color pardo claro y el duramen es pardo oscuro. La madera se vuelve rojiza con la exposición y es dura, pesada, fuerte, de textura tosca y con una fibra irregular. La madera se seca bien al aire y, a pesar de que no se trabaja con facilidad, se puede lijar bien para obtener un buen acabado y es resistente a las termitas y a la pudrición. Es una buena fuente de madera para combustible y tiene un peso específico de 0.47 a 0.75 gramos por cm³ y un valor calórico de 4.91 kcal por gramo. Se usa a veces para la producción de carbón, aunque no existe información específica disponible sobre este uso. (Urbano, Dávila, & Moreno, 2004)

La madera se usa extensamente para postes, traviesas de ferrocarril y para la construcción pesada y localmente para muebles, implementos agro culturales, mangos de herramientas y artículos pequeños. Aunque a veces se considera como no apropiado para la producción de pulpa y papel, cuando se usa para estos propósitos se mezcla usualmente con la madera de otras especies. Las semillas, corteza, hojas y raíces tóxicas se usan para envenenar ratas y otros roedores. A pesar de su reportada toxicidad para los seres humanos cuando se consumen crudas, las flores se comen a veces fritas o hervidas. Las hojas aceleran la maduración de las bananas.

Las flores son una fuente de polen y néctar y tienen un valor considerable en la apicultura. Las hojas recién machacadas se usan como cataplasmas en remedios caseros en algunos lugares. En el estado mejicano de Yucatán, varios componentes de la madre de cacao se usan medicinalmente por sus posibles propiedades antihistamínicas, antipiréticas y diuréticas. (Atta-Krah & Sumberg, 1988)

2.3. Razones para estudiar la digestibilidad

La evaluación de la digestibilidad supone la determinación de, qué cantidad de un determinado nutriente o sustancia alimenticia desaparece del tracto digestivo o dicho de otra forma, qué cantidad de material no se degrada ni se absorbe mientras pasa a través del animal. Este es un aspecto importante en la utilización de los nutrientes, ya que los residuos no digeridos y las excreciones fecales asociadas con la digestión son la única pérdida de mayor relevancia en la utilización de los alimentos, llegando a ser cercano al 40%. (Church, 1974)

Las pruebas de digestión se realizan con varios propósitos:

1. Evaluar la utilización por el animal de un determinado nutriente, o de una ración.
2. Establecer cuantitativamente el aporte de sustancias nutritivas digestibles.

3. Utilización de la digestibilidad en estudios experimentales, haciendo referencia al estudio del efecto de los distintos métodos de preparación de los alimentos, del empleo de aditivos, combinaciones óptimas de los ingredientes de una ración, de la edad, de las diferencias entre las distintas especies, etc. (Cone, A, Visscher, & Oudshoorn, 1996)

2.3.1. Método "in vitro"

Los ensayos de digestibilidad son tan laboriosos de llevar a cabo que se han hecho numerosos intentos para reproducir en el laboratorio las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo del animal, con objeto de poder determinar la digestibilidad de los alimentos por métodos rápidos. Uno de estos métodos es el de digestibilidad *in vitro* que, de acuerdo a un gran número de trabajos, predice digestibilidad *in vivo* con alto grado de precisión. (Tilley & Terry, 1963)

Las posibilidades de imitar las reacciones que ocurren a nivel ruminal son la base de las técnicas *in vitro* desarrolladas por los científicos desde los años sesenta. El método de digestibilidad *in vitro* con licor ruminal inicialmente pretendió simular las condiciones del rumen, al fermentarse una muestra de alimento de composición conocida en un recipiente con una cantidad determinada de fluido ruminal y, posteriormente a un período de incubación, se decantaba la muestra y se determinaba por diferencia la degradabilidad de la materia seca, corrigiendo por el residuo obtenido con el inóculo del rumen. Las correlaciones con respecto a digestibilidad *in vivo* no eran altas, debido a que en el animal la digestión ruminal es seguida por una digestión enzimática en abomaso e intestino. (Posada & Noguera, 2005)

Por lo tanto, estas técnicas fueron reemplazadas por la digestibilidad *in vitro* en dos etapas, que agrega a esta fermentación inicial una digestión enzimática, simulando así las condiciones

encontradas en el abomaso e intestino delgado del rumiante. Esta técnica, como la mayoría de los métodos utilizados para determinar digestibilidad *in vitro* de los forrajes, está diseñada para lograr un resultado que permita predecir los parámetros *in vivo*. (Cone, A, Visscher, & Oudshoorn, 1996)

El método descrito por Tilley y Terry (1963) fue el precursor del método de fermentación *in vitro* en dos etapas, generalmente los métodos desarrollados posteriormente son en su mayoría modificaciones de este, que incorpora "buffer" como fuente de nitrógeno. Otra modificación al método Tilley y Terry es la que sustituye la pepsina de la segunda etapa por solución detergente neutro para determinar FDA, es decir, solubiliza la pared celular bacteriana y los productos endógenos, además de la proteína. (Grant & Mertens, 1992)

Las características que condicionan la validez de los resultados obtenidos por técnicas *in vitro*, que emplean licor ruminal en la evaluación de forraje, son más difíciles de establecer que los métodos químicos. Sin embargo, este método es un método biológico, que considera la estructura física como la composición química de la muestra de forraje, puesto que ésta es digerida por microorganismos del rumen. La digestibilidad *in vitro* es un método, que se basa en el principio de someter una muestra de forraje en un recipiente a la acción de inóculo de líquido ruminal, con el fin de asimilar las condiciones naturales que ocurren en el rumiante. Después de un determinado tiempo se mide la cantidad de materia seca (MS), materia orgánica (MO) o celulosa que ha desaparecido durante la incubación, la proporción desaparecida se denomina digestibilidad *in vitro*. El método *in vitro* presenta un inconveniente en la determinación de la digestibilidad de MO y de la MS, esto se debe a la baja correlación de éstas con los valores correspondientes a las digestibilidades *in vivo*. (Van Soest, 1964)

Esto se debía a una fracción proteínica, asociada a la pared celular, la cual no se hacía soluble ante el tratamiento con licor ruminal, subestimando los valores de digestibilidad de MO y MS. Para resolver este problema, se propuso tratar las muestras con pepsina diluida en HCl, carbonato de sodio (NaCO_3) y tripsina en buffer de carbonato de sodio, entre otros, con el objetivo de solubilizar la proteína, simulando lo que ocurriría en condiciones naturales en el abomaso de un rumiante. Dentro de los muchos métodos químicos y biológicos descritos para predecir la digestibilidad *in vivo* de los alimentos, el propuesto por Tilley y Terry (1963) aún se reconoce como uno de los más interesantes. Este conocido como "two - Stage", se basa en la acción de dos tratamientos consecutivos, uno biológico y el otro químico, sobre la muestra a analizar. El tratamiento biológico se refiere a una digestión anaeróbica de una muestra seca de forraje con microorganismos ruminales, a 38 °C por 48 h y bajo oscuridad. Esta digestión debe hacerse en tubos de vidrio asegurándose que la producción de gas, como consecuencia de la fermentación mantiene la condición de anaerobiosis. Además del licor ruminal se debe agregar un cierto volumen de solución buffer, capaz de mantener un pH adecuado para la digestión. El segundo paso de este método, el tratamiento químico, consta de una digestión en pepsina, cuya finalidad es solubilizar la gran proporción de proteína que resiste al tratamiento biológico previo. (Tobal, 1999)

Es condición importante en este método que la digestión sea anaerobia, a una temperatura de 39 – 40 °C y a un pH constante de 6.8 a 6.9. Esto último se consigue utilizando soluciones tampones o "salivas artificiales" de manera que el grado de acidez final no exceda del normal en el rumen (Tilley & Terry, 1963). Así, también se han usado proporciones diferentes de inóculo / tampón y del número de bacterias presentes en el inóculo. Se observó que, aunque el método original indica agitar los tubos de incubación 3 o 4 veces al día como mencionaron Tilley y Terry (1963) como

también hay autores que indican que esto no es necesario. Sin embargo, trabajos de MelleMBERGER *et al.*, (1970) determinaron que la agitación aumentaba la tasa de desaparición de la MS, produciendo mayores coeficientes de digestibilidad. (Groot, Cone, Williams, Debersaques, & Lantinga, 1996)

Tilley y Terry (1963) fijaron el tiempo de incubación en 48 h, aun cuando exista evidencia experimental de que la digestión de la celulosa puede prolongarse más que ese tiempo, aumentando el valor de digestibilidad obtenido y disminuyendo los coeficientes de variación. Considerando que al cabo de las 48 h el proceso de digestión de los carbohidratos estructurales es prácticamente completa, lo que no ocurre en este período sería la solubilización de la proteína potencialmente digestible del forraje. Esto explica en parte el fenómeno del aumento aparente de la digestibilidad, cuando la incubación se prolongaba más allá del tiempo indicado. En base de esto, se propuso la incorporación de una segunda etapa del método consistente en una digestión proteica con pepsina. Esta etapa no requiere de condiciones anaeróbicas; pero se necesitan otras 48 h más a 39-40 °C, es habitual que la digestibilidad *in vitro* se evalúe con alguna modificación a través de la técnica creada por Tilley y Terry (1963).

En los laboratorios donde se usa esta metodología en forma rutinaria, los animales donantes del licor ruminal se alimentan con una alimentación estándar, como, por ejemplo, heno de alfalfa de regular calidad. Este hecho podría ser adecuado para determinada circunstancia; pero podría inducir a alteraciones de importancia cuando se evalúe material proveniente de ambientes diferentes. Así, en el ejemplo recién citado, esta alimentación podría ser adecuada en Chile para forraje de riego, sin embargo, su utilización en forrajes provenientes de praderas mediterráneas senescentes o en paja de trigo, podría modificar substancialmente la digestibilidad que tienen estos

forrajes. El método *in vitro* tiene la dificultad que presupone el tener que mantener animales fistulados en el rumen, que deben ser de la misma especie, ya que se ha observado que, con la utilización de jugo ruminal de especies diferentes, se obtienen resultados distintos. Se ha observado que el método *in vitro* subvalora la digestibilidad en aquellos rangos inferiores a 65 %, lo cual puede deberse a falta de tiempo de fermentación con licor ruminal, especialmente en forrajes de menor calidad. Por otra parte, la fase de hidrólisis con pepsina ácida, en forrajes que son bajos en proteínas, podría eliminarse. (Menke, y otros, 1979)

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización geográfica

La presente investigación se realizó en los laboratorios e instalaciones de la finca experimental “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo ubicada en el km 7 vía Quevedo – El Empalme, en el cantón Mocache, provincia de los Ríos.

3.2. Condiciones Agro meteorológicas

Altitud: 73 msnm

Longitud: 79° 29'O

Latitud: 01° 06' S

Temperatura máxima: 32°C

Temperatura mínima: 22°C

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Material de laboratorio

- ✓ Líquido ruminal de un bovino fistulado, alimentado con forraje de buena calidad
- ✓ Termo doméstico con capacidad de 1L
- ✓ Gaza de uso clínico (50 x 10 cm)
- ✓ Fibra de vidrio (pelo de ángel)
- ✓ Papel filtro de fibra de vidrio, laboratorios Gelman (tipo A/E 47 mm)

- ✓ Probetas de 100, 250 y 500 ml
- ✓ Pipeta semiautomática con perilla auxiliar (capacidad de 25 ml)
- ✓ Charolas de aluminio de 60 ml de capacidad, tipo repostería
- ✓ Embudos para filtrar de cristal y porcelana
- ✓ Desecador
- ✓ Espátulas
- ✓ Vasos de precipitado con capacidad de 200, 500, 2000 y 3000 ml
- ✓ Pinza de mango largo
- ✓ Guantes de uso industrial y de asbesto
- ✓ Matraz de 750 y 1000 ml

3.3.2. Equipo de laboratorio

- ✓ Estufa bacteriológica ajustada a 39°C.
- ✓ Sistema y contenedor para suministro de CO₂.
- ✓ Parrilla eléctrica con agitación.
- ✓ Bomba de vacío y sistema para filtración.
- ✓ Balanza analítica de precisión.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Horno mufla con temperatura de hasta 550°C
- ✓ Estufa de aire forzado con niveles de 50 a 100°C (secado de muestras)
- ✓ Estufa para secado a 100°C
- ✓ Molino Thomas Wiley
- ✓ Digestor DAISY II

- ✓ Centrifuga

3.3.3. Reactivos y soluciones de laboratorio

- **Fibra en Detergente Neutra**

- ✓ Solución de detergente neutro (SDN): por cada litro de solución
- ✓ 30,0 g de lauril sulfato de sodio (SDS)
- ✓ 18.61 g de EDTA-sodio di hidratado
- ✓ 6,81 g de tetra borato de sodio deca hidratado
- ✓ 4,56 g de fosfato dibásico de sodio anhidro
- ✓ 10 ml de trietilenglicol,
- ✓ Agitar y calentar la solución hasta ebullición para garantizar la estabilidad de la misma.
- ✓ Ajustar el rango de pH entre 6,9 y 7,1.
- ✓ Alfa-amilasa- alfa amilasa bacteriana termoestable, actividad = 340,000 modificado
Wohlgemuth Units/ml
- ✓ Sulfito de sodio - Na_2SO_3 anhidro.
- ✓ Acetona

- **Fibra en Detergente Acida**

- ✓ Solución de Detergente Ácido (SDA): por cada litro de solución
- ✓ 20 g bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB o Cetrimida)
- ✓ 27.7 ml ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado.
- ✓ Acetona

3.4. Métodos

3.4.1. Diseño Experimental

El diseño experimental usado en esta investigación fue un DCA

3.4.2. Factor en estudio

Mezcla forrajera de gramínea (pasto King grass *Pennisetum purpureum x Pennisetum typhoides*) y leguminosa (Mata ratón (*Gliricidia sepium jacq.*))

3.4.3. Tratamientos

Es la combinación de gramínea y leguminosa en diferentes concentraciones, definiendo los siguientes tratamientos que fueron objetos de investigación:

T1 = 100 %Pasto King Grass

T2 = 90 %Pasto King Grass- 10% Mata ratón

T3 = 80 %Pasto King Grass – 20% Mata ratón

T4 = 70% Pasto King Grass – 30% Mata ratón

T5 = 60 %Pasto King Grass – 40% Mata ratón

T6 = 100% Mata ratón que será evaluado con fines de comparación

3.4.4. Unidad Experimental

Las unidades experimentales fueron 210 fundas de Nylon (F57 ANKON); que contenían a los diferentes tratamientos (6), con 5 repeticiones; en los diferentes tiempos de incubación evaluados (0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h).

3.4.5. Análisis Estadístico

Para el análisis de resultados se realizó con los Procedimientos de Modelos Lineales Generales (PROC – GLM), mediante el uso del programa de análisis estadístico SAS (2004), así como también para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con una probabilidad del 5%.

3.4.6. Variables en estudio

- ✓ Degradabilidad de MS, MI y MO.
- ✓ Degradabilidad de FDN Y FDA.

3.4.7. Procedimientos Experimentales (Protocolo)

3.4.7.1. Incubaciones In Vitro

Para los análisis de degradabilidad de MS y MO los tratamientos se insertaron en bolsas de degradabilidad F57 marca ANKON, las cuales se las identifico para ser colocadas en la estufa por el lapso de tiempo de 48 horas a 65 °C las que posteriormente se las peso en balanza analítica y luego se registró su peso seco.

Consecuentemente a esto se procedió a llenar las bolsas con 300-500 mg de la muestra previamente molida, luego de esto las bolsas F57 fueron selladas con un sellador térmico para la posterior colocación en el digestor DAISY II, cada muestra se incubo por los periodos de tiempo: 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Después de la extracción del digestor, las bolsas F57 se las lavaron en agua corriente fría, hasta que se obtenga agua cristalina. Las bolsas se desecaron primeramente al ambiente, y luego se las ingreso a un horno de aire forzado por 48 h a 65 °C, para finalmente ser pesadas.

3.4.8. Determinación de la degradabilidad ruminal.

3.4.8.1. Degradabilidad de materia seca (MS) y orgánica (MO)

Los porcentajes de degradabilidad de MS y MO, se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de degradabilidad} = \frac{Q_1(\text{g}) - Q_2(\text{g})}{Q_1(\text{g})} \times 100$$

Dónde:

Q1= Cantidad inicial antes de la incubación de la muestra en el digestor

Q2= Cantidad residual después de la incubación de la muestra en el digestor

Para la determinación de la degradabilidad de la MS, se procedió a llevar las bolsas a un horno de aire forzado a 65 °C por un tiempo de 48 horas, luego se colocaron en un desecador, y después se registró su peso. La pérdida de peso se consideró como el valor de degradabilidad.

La degradabilidad de la MO, se calculó en un segundo análisis. Para el efecto se pesó 1 g de muestra en un crisol desecado en estufa a 135 °C por dos horas. El crisol más la muestra, se

colocaron en una estufa a 65 °C por 40 horas, después de ese tiempo fueron extraídos y colocados en un desecador por 15 min. Por diferencia se determinó el porcentaje MS, usando las siguientes fórmulas:

$$H = \frac{(\text{Peso húmedo muestra} - \text{peso seco muestra})}{\text{Peso húmedo muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Materia Seca} = 100 - H$$

Luego, los crisoles con la muestra seca, se colocaron en una mufla a 600 °C por 3 horas. Extraídos los crisoles de la mufla se colocaron en un desecador por 10 minutos y se pesaron. En el cálculo del contenido de cenizas y materia orgánica se usaron las siguientes expresiones matemáticas:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{peso del crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso crisol vacío})}{\text{Peso muestra seca}} \times 100$$

$$\% \text{ Materia Orgánica} = 100 - \text{Cenizas totales}$$

3.4.8.2. Degradabilidad de fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA).

Para determinar la fibra detergente neutra y ácida se utilizó el procedimiento de la tecnología Ankom.

3.4.8.3. Digestibilidad de la fibra detergente neutra (FDN)

3.4.8.3.1. Preparación de la muestra

- La muestra fue molida en un micro molino que contenga un tamiz de abertura de 1 mm y que a través de él pase un 95 % del producto.
- Se transfirió rápidamente la muestra molida y homogenizada a un recipiente herméticamente cerrado, hasta el momento del análisis.
- Se secó las bolsas filtro F57 a 65 °C por 48 horas.
- Las bolsas fueron posteriormente pesadas y rotuladas.
- Para colocar la muestra en las bolsas filtro se pesó aproximadamente de 300 a 500 mg.

3.4.8.3.2. Procedimiento

Preparación de la solución detergente neutra.

- Se pesó 120 g de solución detergente neutra.
- En un matraz con 2000 ml de agua destilada se agregó 120 g de solución detergente neutra.
- Para lograr su total disolución se removió con un agitador la misma que se dejó en reposo por 24 horas.
- A las 24 horas se verificó la acidez con un potenciómetro y se calibró el pH con una solución de hidróxido de sodio a 6.0 a 7.1
- Se colocó las bolsas filtro con muestra en las celdas que se encuentran en el interior del equipo analizador de fibra.
- Se adicionó la solución detergente neutra (2 L) en la cisterna del equipo analizador de fibra y se selló.
- Se activó los botones rojos (calentar) y azul (agitar).
- Luego se dejó que suba la temperatura a 100 °C y se esperó un tiempo de 75 minutos.
- Luego del tiempo de análisis se realizó tres enjuagues con agua a 70 °C

- Posteriormente se escurrió las bolsas y se depositó en 200 ml de acetona por 15 minutos.
- Las bolsas fueron secadas a 65 °C por 48 horas en una estufa, y luego pesadas en una balanza analítica.

3.4.8.3.3. Cálculos

El contenido de fibra detergente neutra en los alimentos se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$CC = \frac{PMH - PMS}{PMS} \times 100$$

$$FDN = 100 - CC$$

Siendo:

CC = Contenido celular

P. M. H = Peso de muestra húmeda

P. M. S = Peso seco de la muestra

FDN = Fibra detergente neutra

3.4.8.4. Digestibilidad de la fibra detergente ácida (FDA)

3.4.8.4.1. Preparación de la solución detergente ácida

- Se pesó 40 g de solución detergente ácida.
- En un matraz con 2000 ml de agua destilada se agregó 40 g de solución detergente ácida.

- Para lograr su total disolución se removió con un agitador la misma que se dejó en reposo por 24 horas.
- A las 24 horas se verificó la acidez con un potenciómetro y se calibró el pH con una solución de hidróxido de sodio a 6.0 a 7.1
- Se colocó las bolsas filtro con muestra en las celdas que se encuentran en el interior del equipo analizador de fibra.
- Se adicionó la solución detergente neutra (2 L) en la cisterna del equipo analizador de fibra y se selló.
- Se activó los botones rojos (calentar) y azul (agitar).
- Luego se dejó que suba la temperatura a 100 °C y se esperó un tiempo de 75 minutos.
- Luego del tiempo de análisis se realizó tres enjuagues con agua a 70 °C
- Posteriormente se escurrió las bolsas y se depositó en 200 ml de acetona por 15 minutos.
- Las bolsas fueron secadas a 65 °C por 48 horas en una estufa, y luego pesadas en una balanza analítica.

3.4.8.4.2. Cálculos

El contenido de fibra detergente ácida en los alimentos se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Muestra seca} = \frac{\text{BMS (BMS - BS)}}{\text{MSFDN - MSFDA}}$$

$$\mathbf{H} = \frac{\text{MSFDN} - \text{MSFDA}}{\text{MSFDN}} \times 100$$

$$\mathbf{FDA} = \text{FDN} - \mathbf{H}$$

Siendo:

B. M. S = Bolsa más muestra seca

B. S. = Bolsa Seca

H = Hemicelulosa

M. S. FDN = Muestra seca fibra detergente neutra

M. S. FDA = Muestra seca fibra detergente ácida

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Degradabilidad *in vitro* de materia seca (MS)

Los resultados de la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se presentan en la tabla 1 y figura 1, la misma que indica la presencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados en las distintas horas de incubación. Se evidencia que a la 0, 48 y 72 h existen dos rangos de significancia estadística ($p < 0.05$). Los tratamientos con la inclusión de 0 y 30% de mata ratón presentaron los más altos valores de DIVMS, con 21.70 y 21.33% a las 0 h de incubación, respectivamente. A las 48 h de incubación ruminal *in vitro* el tratamiento con 20% de inclusión de la forrajera, presentó el 58.97% de DIVMS siendo este valor superior y diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos estudiados; por otra parte, a las 72 h de incubación los tratamientos con 10 y 20% de la forrajera presentaron los mayores valores de DIVMS, aunque los tratamientos con 0, 10, 20 y 40% presentaron similitud estadística al igual que los tratamientos con 30 y 100% de inclusión. No se evidenció cambios en la DIVMS ($p > 0.05$) entre los tratamientos a las 24 h de incubación, sin embargo, a las 3, 6 y 12 h se observó tres rangos de significación estadística ($p < 0.05$), presentándose los mayores valores de la DIVMS en los tratamientos con 30 (36.71% a las 12 h) y 100% de inclusión de mata ratón (30.86% a las 3h, 33.52% a las 6 h y 37.80% a las 12 h).

Por otra parte, los parámetros de DIVMS presentaron que el tratamiento con la mayor fracción soluble (a) la evidenció el que poseía 30% de inclusión de la forrajera, aunque este tratamiento compartió significancia estadística con aquellos que poseían 0, 10, 20 y 100%; sin embargo, la

inclusión del 40% de la forrajera provocó la menor solubilidad de la asociación gramínea-leguminosa (15.68%). La fracción potencialmente degradable (b) de los tratamientos, presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); siendo mayor para el de 20% de inclusión (50.01%), aunque se presentó el menor valor en el tratamiento de 100% de la forrajera (30.10% de DIVMS). No se evidenció diferencias estadísticas en el parámetro de tasa de degradación ruminal (kd, %/h de desaparición) de los diferentes tratamientos. La variable de degradabilidad efectiva (%) con una tasa de pasaje ruminal del 2% (D2) fue mayor (49.10%) para el tratamiento con 20% de inclusión de mata ratón, sin embargo, con una tasa de pasaje del 5 y 8% el tratamiento del 100% de mata ratón, presentó la más alta tasa de degradabilidad efectiva, con 38.00 y 35.06%, respectivamente.

Tabla 1

Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Materia Seca (MS) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mataratón

Incubación, Hora	Mataratón											
	0%*	10%		20%		30%		40%		100%		
0	21.70	a	17.86	a	19.89	a	21.33	a	12.41	b	16.62	a
3	25.24	b	21.61	c	23.35	b	27.40	a	23.17	b	30.86	a
6	26.90	b	22.62	c	25.82	b	30.44	a	26.04	b	33.52	a
12	28.48	b	22.87	c	31.09	a	36.71	a	31.29	a	37.80	a
24	36.50	a	35.64	a	46.84	a	39.50	a	41.07	a	39.31	a
48	50.63	b	50.63	b	58.97	a	46.64	b	50.96	b	47.38	b
72	55.11	a	63.33	a	62.89	a	54.05	b	60.20	a	51.65	b
Parámetros de Degradabilidad												
a	20.98	a	17.26	a	18.24	a	22.54	a	15.68	b	19.10	a
		b		b		b						b

CONTINUA→

b	39.03	b	46.31	a	50.01	a	30.48	c	44.27	a	30.10	d
a+b	60.01	c	63.58	b	68.25	a	53.03	d	59.95	b	49.21	d
kd	0.029	c	0.023	b	0.032	a	0.050	d	0.104	c	0.084	a
D2%	42.86	a	42.29	a	49.10	a	45.18	a	44.67	a	42.85	b
D5%	34.41	b	32.49	b	37.95	a	36.79	b	35.00	a	38.00	a
D8%	30.71	a	27.80	b	32.74	a	33.50	b	30.21	a	35.06	a
		b				b				b		

Nota: abc Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, acorde a las pruebas de Tukey ($p < 0.05$) * 0, 10, 20, 30, 40 y 100 porcentaje de inclusión de mata ratón en la mezcla forrajera (King grass + mata ratón)

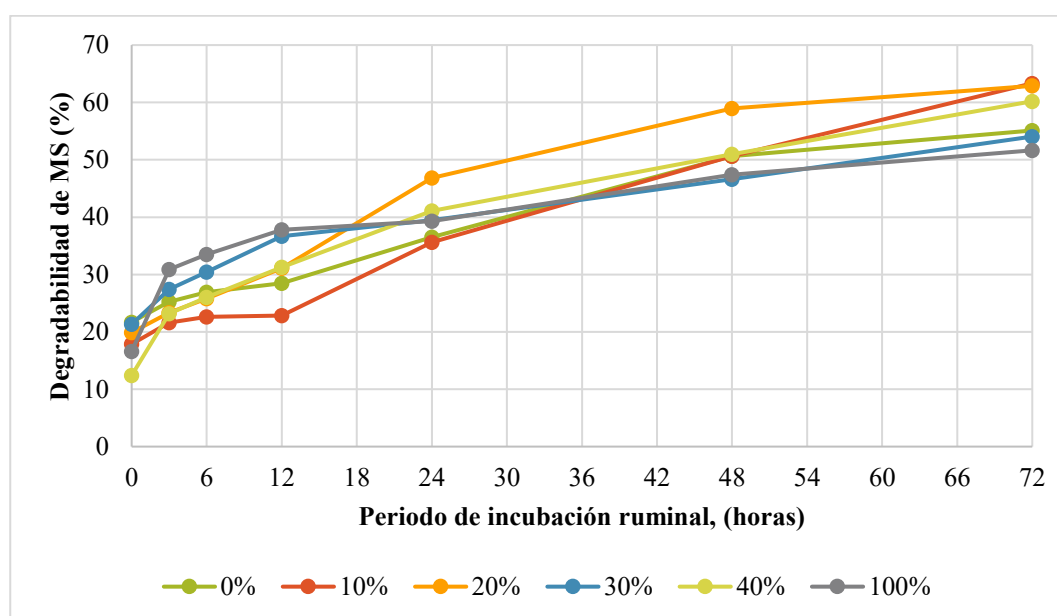


Figura 1. Cambios de la degradabilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) del Pasto King Grass asociado a niveles de Mata ratón (*Gliricidia sepium*)

Vistos los resultados de la presente investigación, se puede mencionar que las dietas estudiadas están dentro de la clasificación de mediana calidad (alta calidad aquellas con aproximadamente 70% de DIVMS) Di Marco (2011) ya que poseen valores al mayor tiempo de incubación ruminal (72 h), superiores a 51.65% de DIVMS. En este contexto de suplementación forrajeras de gramíneas tropicales con leguminosas (L), especies arbustivas (A) o árboles multipropósitos (AMP), Manaye et al. (2009) evaluaron la combinación del pasto Elefante (*Pennisetum purpureum*)

con el AMP *Sesbania sesban*, observando que la adición de esta forrajera mejoró significativamente la digestibilidad de las mezclas estudiadas al compararse con la del pasto Elefante como única fuente alimenticia. Similarmente, en estudios previos desarrollados por Kariuki et al. (1999) suplementación de la dieta basal de pasto Elefante con *Desmodium* o Lucerna); y Kahindi et al. (2007) suplementación de la dieta basal de pasto Elefante con *Pithecellobium dulce*), se reportó mejoró la digestibilidad de la materia seca de las dietas, conduciendo esto a una mejora característica productiva de los animales evaluados.

De acuerdo con Solomon (2001) la mejora en las características de digestibilidad por la adición de AMP a gramíneas tropicales, se debe a los cambios favorables que experimenta el medio ruminal por la mayor concentración de nitrógeno que se proporciona para el crecimiento microbiano (McMeniman et al. 1988; Leng, 1990, Boufennara et al. 2012) provocando que exista una mayor concentración de amoníaco en el rumen que conlleva al incremento de la población de bacterias celulolíticas, a una subsecuente incremento en la extensión de la digestión Belachew et al. (2013) y a un mayor flujo de la digesta. (Manyuchi et al. 1997)

Si bien es cierto, en el presente estudio no se evidenciaron aumentos lineales de la DIVMS por efecto de la suplementación incremental de Mata ratón (*Gliricidia sepium*), se pueden observar tendencias positivas cuando estas se utilizó hasta un nivel de 40%. Por otra parte, cuando se analizó los parámetros de degradabilidad, la fracción soluble (a), esta experimentó una disminución numérica marcada cuando se adicionó el 40% de Mata ratón; siendo estos resultados contrarios a los reportados por Kabí et al. (2005) y, Tessema y Baars (2004), quienes encontraron mejoras significativas de los parámetros de degradabilidad (a, b, kd y degradabilidad efectiva) por la adición de *Gliricidia sepium* y *Sesbania sesban*, respectivamente, a dietas constituidas por *Pennisetum*

purpureum. En la presente investigación, los otros parámetros de fermentación ruminal no presentaron cambios claros asociados a la suplementación de la forrajera, coincidiendo estos resultados con los reportados por Barros-Rodríguez et al. (2013) quienes evaluaron la inclusión de *Leucaena leucocephala* a dietas conformadas por *Pennisetum purpureum* como elemento base, estos autores presumieron que la falta de respuesta a la adición de la leguminosa, se debió a un desbalance dietario en la concentración de compuestos nitrogenados y el contenido de energía digestible.

4.1.1. Degradabilidad *in vitro* de Materia Orgánica (MO)

Los resultados de la degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) se presentan en la tabla 2 y figura 2. Estos resultados demuestran que no existió diferencias estadísticas, ($p>0.05$) a la 0, 6, 24 y 48 h de incubación entre los diferentes tratamientos estudiados, sin embargo las 3, 12 y 72 h de incubación los tratamientos con los diferentes niveles de inclusión de la forrajera mata ratón, demostraron tres rangos de significación ($p<0.05$), detectándose que a las 3 y 12 h el tratamiento del 100% de mata ratón tuvo el mayor porcentaje DIVMO, mientras que este comportamiento de supremacía en la DIVMO se encontró con el 10% de la forrajera.

En lo referente a los parámetros de degradabilidad ruminal no se encontró diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) para la fracción soluble (a) y la tasa de degradabilidad (kd, %/h de desaparición ruminal), sin embargo, el tratamiento con 20% de mata ratón presentó el mayor porcentaje (63.65%) de la fracción potencialmente degradable. El parámetro de degradabilidad efectiva con una tasa de pasaje del 2% (D2) no presentó diferencias significativas ($p>0.05$), sin embargo, cuando la tasa de pasaje fue del 5 y el 8% la tasa de degradabilidad presentó cambios

significativos siendo mayor para el tratamiento con el 100% de la forrajera, con valores de 36.35 y 32.64%, respectivamente.

Tabla 2

Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Materia Orgánica (MO) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón

Incubación, Hora	Mata Ratón											
	0%*	10%		20%		30%		40%		100%		
0	14.08	a	13.54	a	8.46	a	13.54	a	5.70	a	15.88	a
3	17.25	a	14.75	a	14.48	b	18.10	a	12.02	b	27.74	a
6	19.94	a	14.84	a	19.39	a	24.85	a	17.23	a	30.12	a
12	22.56	b	15.16	c	21.84	b	28.25	a	27.15	a	34.38	a
24	30.92	a	31.99	a	36.74	a	31.84	a	32.94	a	41.40	a
48	42.50	a	44.24	a	57.27	a	43.05	a	48.78	a	45.79	a
72	48.28	b	66.54	a	60.71	a	54.08	a	62.72	a	56.62	a
						b		b		b		b
Parámetros de Degradabilidad												
a	13.52	a	10.38	a	6.51	a	15.57	a	7.44	a	18.65	a
b	37.21	b	54.00	a	63.65	a	42.89	a	55.60	a	37.49	b
				b				b		b		
a+b	50.73	a	64.38	a	70.16	a	58.46	a	63.04	a	56.14	a
kd	0.031	a	0.023	a	0.029	a	0.025	a	0.032	a	0.072	a
D2%	35.75	a	39.64	a	43.86	a	39.23	a	41.41	a	43.67	a
D5%	27.54	b	27.73	b	29.96	a	29.83	a	28.92	b	36.35	a
						b		b				
D8%	23.79	b	22.70	b	23.66	b	25.78	a	23.15	b	32.64	a
								b				

Nota; abc Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, acorde a las pruebas de Tukey ($p < 0.05$)

* 0, 10, 20, 30, 40 y 100 porcentaje de inclusión de mata ratón en la mezcla forrajera (King grass + mata ratón)

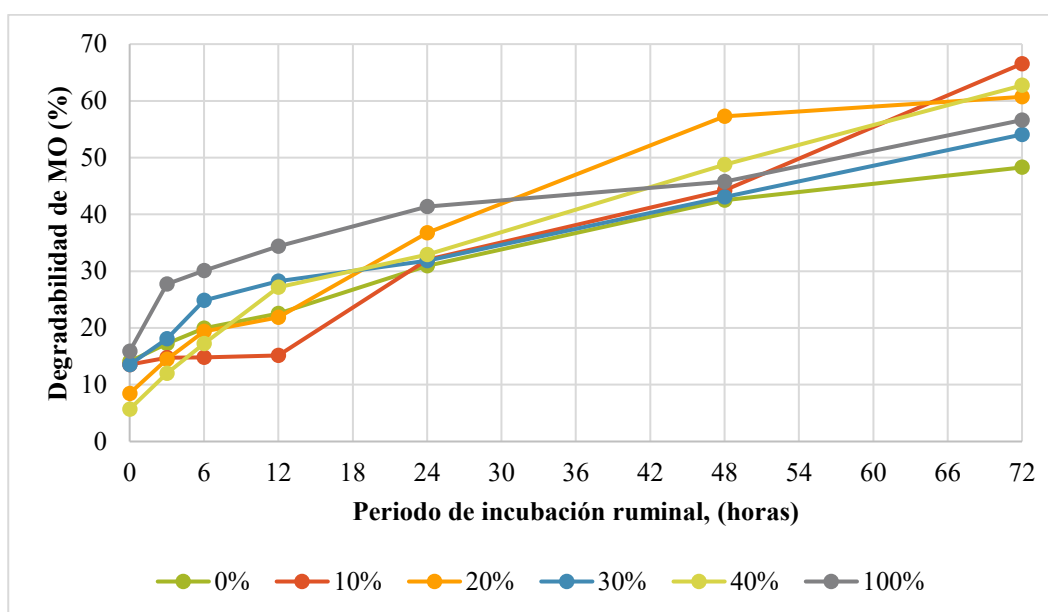


Figura 2. Cambios de la degradabilidad in vitro de la materia orgánica (DIVMO) del pasto King Grass asociado a niveles de Mata ratón (*Gliricidia sepium*)

La digestibilidad es un factor importante del valor nutritivo de los alimentos, y mediante ella se evalúa la disponibilidad de los nutrientes del contenido y de las paredes celulares. La materia orgánica digestible de un forraje, es la variable que predominantemente se asocia al crecimiento de la proteína microbiana que sustenta al medio ruminal y por lo tanto a la mayor capacidad productiva de los animales, sin embargo, la digestibilidad de la materia orgánica tiene una correlación negativa con las fracciones fibrosas de los forrajes (Forejtová et al. 2005). Las gramíneas poseen una mayor concentración de carbohidratos estructurales, los cuales pueden afectar a la digestibilidad de los componentes nutricionales solubles presentes en la materia orgánica; motivo por el cual, se busca su asociación con leguminosas forrajeras ya que poseen un menor contenido de fibra, con la posibilidad de mejorar la disponibilidad de los nutrientes. En este contexto, en la presente investigación no se pudo evidenciar el efecto mejorador de la inclusión de leguminosas en la digestibilidad de los componentes orgánicos de los tratamientos estudiados, resultados que

coinciden con los expuestos por Mero y Udén (1990), quienes al evaluar el efecto de la suplementación de *Leucaena leucocephala* sobre la mejora de la digestibilidad de pastos del género *Cynodon*, determinaron que el empleo de leguminosas no provoca diferencias entre los tratamientos. Por su parte, Souza et al. (2014) quienes al estudiar la adición de la leguminosa *Stylosanthes capitata*, a dietas cuya constitución básica forrajera fue el ensilaje de maíz, pudieron evidenciar que no se presentó mejora en la digestibilidad de la materia orgánica de la gramínea estudiada; en este caso, se presume que esta carencia de diferencia entre tratamientos, se debe a que la calidad del ensilaje de maíz fue elevada y la leguminosa no tuvo efectos compensatorios de la calidad en la mezcla. Sin embargo, Tessema y Baars (2004) reportaron respuestas diferentes a los estudios anteriormente expuestos, toda vez que encontraron que todos los parámetros de degradabilidad ruminal fueron mejorados con la suplementación incremental del AMP *Sesbania sesban*; estos autores presumen que estos resultados positivos de los parámetros de degradabilidad se deben a que este AMP tiene bajos niveles de fibra que se degradada rápidamente a nivel ruminal.

4.1.2. Degradabilidad in vitro de materia inorgánica (MI)

Los resultados de la degradabilidad *in vitro* de la materia inorgánica (DIVMI) se presentan en la tabla 3 y figura 3; observándose que para la DIVMI no se registró diferencias significativas ($p > 0.05$) (Tabla 3) a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación, pero si a las 0 horas, presentando dos rangos de significación ($p < 0.05$), siendo el tratamiento con la inclusión del 20% el que presento el mayor porcentaje de degradabilidad (53.86%) y 30 (49.90%) por ciento de mata ratón, los que tuvieron mayor porcentaje de degradabilidad.

En lo referente a los parámetros de degradabilidad ruminal se encontró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), donde el tratamiento con 20% presento el mayor porcentaje de la fracción

soluble (a), con un 56.01% de desaparición, mientras que el tratamiento con 10% de inclusión presento la menor fracción soluble. El mayor porcentaje de la fracción potencialmente degradable (b) la presento el tratamiento con el 10% de inclusión de la forrajera (40.91%) y en contraposición se encontró que el tratamiento con el 100% de la forrajera presento el menor porcentaje de la fracción b (17.48%). La tasa de degradación (kd) y la degradabilidad efectiva con sus tasas de pasaje en los diferentes porcentajes (2, 5 y 8%), no presentaron diferencias estadísticas.

Tabla 3

Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Materia Inorgánica (MI) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón

Incubación, Hora	Mata ratón											
	0%*		10%		20%		30%		40%		100%	
0	44.56	ab	31.76	B	53.86	a	49.90	a	40.99	a	39.58	a
									b	b	b	b
3	59.55	a	52.21	A	58.70	a	54.22	a	43.37	a	42.42	a
6	62.38	a	64.29	A	59.09	a	55.64	a	56.24	a	49.43	a
12	64.17	a	67.27	A	62.83	a	57.69	a	59.26	a	52.60	a
24	66.00	a	71.67	a	64.62	a	60.24	a	61.54	a	54.52	a
48	70.21	a	72.58	A	67.12	a	66.07	a	66.23	a	55.54	a
72	72.82	a	75.42	A	74.54	a	71.23	a	68.57	a	57.92	a
Parámetros De Degradabilidad												
a	45.32	abc	31.68	C	56.01	a	52.35	a	40.19	b	39.02	b
								b	c	c	c	c
b	28.20	ab	40.91	A	20.96	a	27.83	a	27.15	a	17.48	b
						b	b	b	b	b	b	b
a+b	73.52	a	72.59	A	76.97	a	80.18	a	67.35	a	56.50	b
									b	b	b	b
kd	0.301	a	0.238	A	0.025	a	0.013	a	0.095	a	0.120	a
D2%	67.50	a	69.44	A	67.20	a	63.18	a	62.38	a	53.99	a
D5%	64.10	a	65.53	A	62.77	a	58.01	a	57.83	a	51.33	a
D8%	62.30	a	62.35	A	60.88	a	56.18	a	54.92	a	49.48	a

Nota: abc Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, acorde a las pruebas de Tukey ($p < 0.05$) * 0, 10, 20, 30, 40 y 100 porcentaje de inclusión de mata ratón en la mezcla forrajera (King grass + mata ratón)

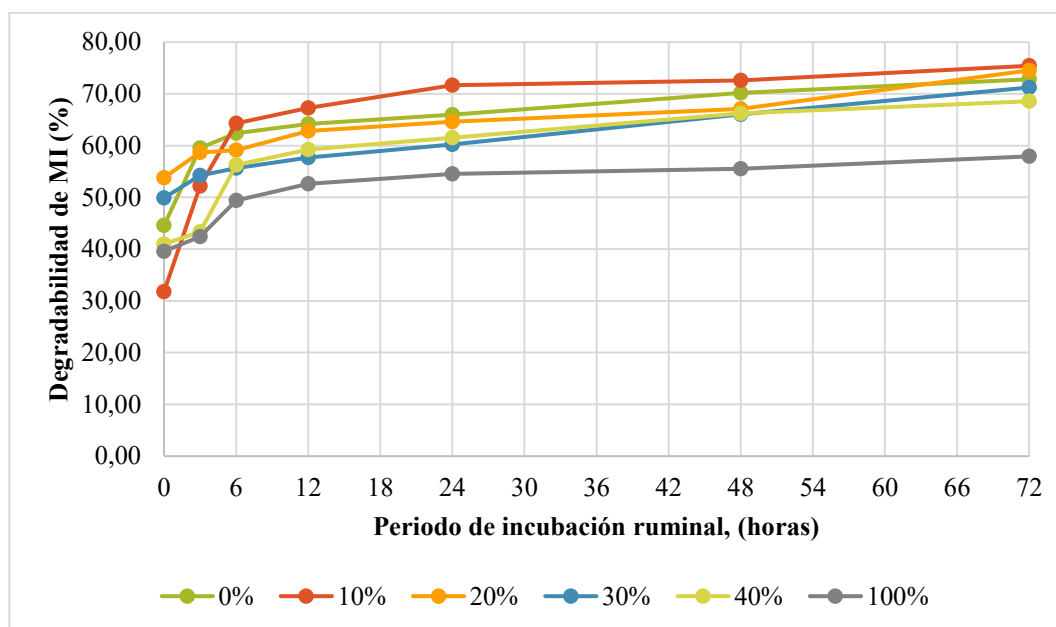


Figura 3. Cambios de la degradabilidad in vitro de la materia inorgánica (DIVMI) del pasto King Grass asociado a niveles de Mata ratón (*Gliricidia sepium*)

En relación a la DIVMI y los cambios del comportamiento de los parámetros de degradación ruminal, en la presente investigación no se evidenció efecto de la inclusión de la *Gliricidia sepium*, presumiéndose que la liberación de los minerales tanto del *Pennisetum purpureum* como de las diferentes mezclas forrajeras tienen un comportamiento similar.

4.1.3. Degradabilidad in vitro de las fracciones fibrosas de la pared celular (fibra en detergente neutro-DIVFDN y fibra en detergente ácido-DIVFDA)

Los resultados de la degradabilidad *in vitro* de la fibra detergente neutra (DIVFDN) se presentan en la tabla 4 y figura 4. Esta variable en estudio demostró que a las 0 h de incubación ruminal in vitro los diferentes tratamientos no presentaron cambios ($p > 0.05$). Por otra parte, a las 3, 6 y 48 h los resultados presentaron diferencias estadísticas con tres rangos de significación ($p < 0.05$) siendo el tratamiento con 30% de inclusión de la forrajera el que demostró el mayor porcentaje de degradabilidad, con 26.38 y 28.18%, para las 3 y 6 h, respectivamente; mientras que a las 48 h el

tratamiento que presentó el mejor DIVFDN fue el que contenía el 20% de mata ratón con 59.98%. A las 12, 24 y 72 h de incubación, se presentó diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con dos rangos de significación, siendo el tratamiento con 30% de la forrajera el que demostró a las 12 h el mayor porcentaje de DIVFDN, con 37.03%; y el de 20% a las 24 y 72 h, con el 59.09 y 65.54% de DIVFDN, respectivamente.

En lo referente a los parámetros de degradabilidad ruminal se encontró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos; observándose que la mayor fracción soluble (a) la presentó el tratamiento con 30% de inclusión de la forrajera; mientras que el tratamiento con 10%, presentó el mayor porcentaje de la fracción potencialmente degradable (b) con un 71.69%. Las mejores tasas de degradabilidad (kd) las presentaron los tratamientos con 20 y 30% de inclusión de la forrajera, con valores de 3.6 y 7.0%/h de desaparición ruminal.

La degradabilidad efectiva, en las diferentes tasas de pasaje presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$); encontrándose el mayor porcentaje con la inclusión de 20 (48.78%) y 30% (35.90 y 32.50%), a las 2, 5 y 8%/h, respectivamente.

Tabla 4

Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Fibra Detergente Neutra (FDN) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón

Incubación, Hora	Mata ratón					
	0%*	10%	20%	30%	40%	100%
0	17.88 a	13.45 A	10.23 a	17.69 a	8.81 a	8.60 a
3	19.57 b	14.37 B	14.70 b	26.38 a	12.04 c	12.19 c
6	21.12 b	15.41 C	18.32 b	28.18 a	14.09 c	15.71 b

CONTINUA →

12	25.20	b	17.57	B	24.85	b	37.03	a	18.90	b	18.92	b
24	34.33	ab	26.09	b	50.09	a	40.01	ab	39.10	ab	23.32	b
48	55.97	ab	41.55	C	59.98	a	45.03	bc	47.20	bc	38.73	c
72	62.60	ab	56.18	A	65.54	a	51.33	ab	57.46	ab	45.30	b
				b								
Parámetros De Degradabilidad												
a	15.43	ab	10.88	B	7.92	c	18.89	a	7.15	c	9.41	b
				c								c
b	50.65	d	71.69	A	64.65	a	30.02	e	61.25	bc	55.11	c
						b						d
a+b	66.09	bc	82.57	A	72.57	b	48.91	d	68.40	bc	64.51	c
kd	0.027	b	0.012	B	0.036	a	0.070	a	0.025	b	0.015	b
						b						
D2%	44.29	ab	37.76	B	48.78	a	41.73	ab	40.57	abc	32.80	c
				c				c				
D5%	33.02	ab	24.83	B	34.41	a	35.90	a	27.22	abc	22.08	c
				c								
D8%	28.08	ab	20.31	B	27.54	a	32.50	a	21.52	bc	18.10	c
				c		b						

Nota: abc Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, acorde a las pruebas de Tukey ($p < 0.05$)
 * 0, 10, 20, 30, 40 y 100 porcentaje de inclusión de mata ratón en la mezcla forrajera (King grass + mata ratón)

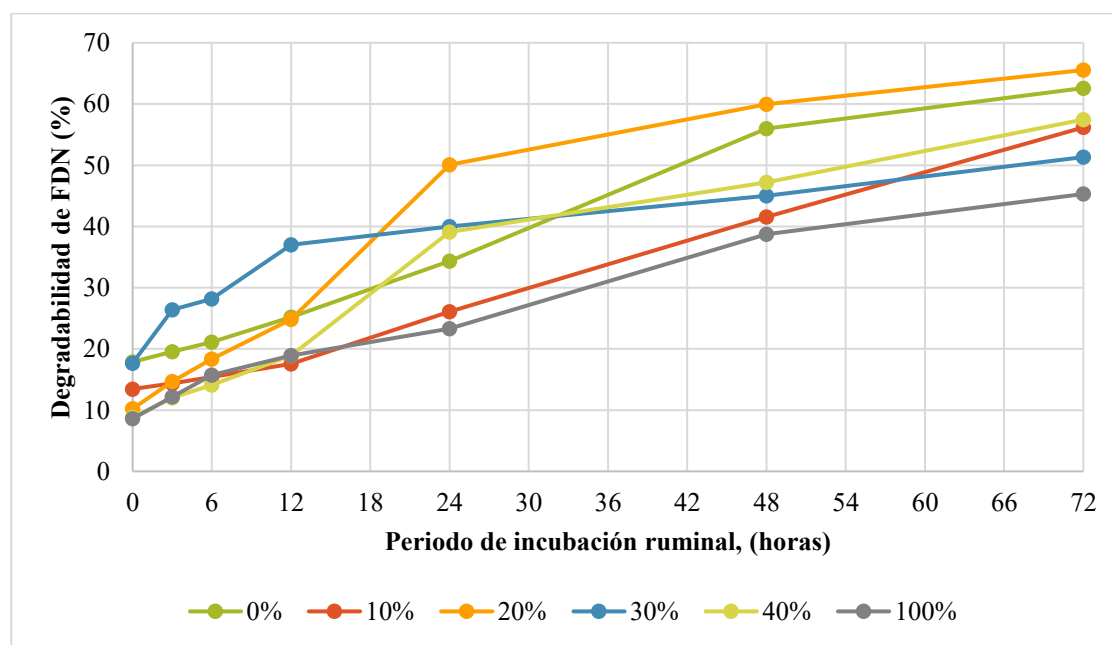


Figura 4. Cambios de la degradabilidad in vitro de la fibra detergente neutro (DIVFDN) del pasto King Grass asociado a niveles de Mata ratón (*Gliricidia sepium*)

En la degradabilidad in vitro de Fibra Detergente Ácida (DIVFDA), se observó que no hubo cambios ($p>0.05$) en la degradabilidad a las 24 y 72 horas de incubación (tabla 5 y figura 5). A las 0, 3, 6 y 12 horas de incubación se detectó dos rangos de significación ($p<0.05$) correspondiendo la mayor degradabilidad a los tratamientos que se incluyó el 10 (33.73%, 37.03% y 38.16% a las 0, 3 y 6 h respetivamente), y 100% (42.05 % a las 12 h) de mata ratón. A las 48 horas de incubación se diferencian tres rangos de significación, presentando el mejor porcentaje de degradabilidad el tratamiento que tiene el 20% (57.88%) de mata ratón.

En lo referente a los parámetros de degradabilidad ruminal se encontró diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos; observándose que la mayor fracción soluble (a) la presentó el tratamiento con 10% de inclusión de la forrajera; mientras que el tratamiento con 0%, presentó el mayor porcentaje de la fracción potencialmente degradable (b) con un 57.61%. La tasa de degradación (kd) y la degradabilidad efectiva con sus tasas de pasaje en los diferentes porcentajes (2, 5 y 8%), no presentaron diferencias estadísticas.

Tabla 5

Promedios (%) de degradabilidad in vitro de Fibra Detergente Ácida (FDA) a diferentes tiempos de incubación de la mezcla de pasto king grass con mata ratón.

Incubación, Hora	Mataratón										
	0%*	10%	20%	30%	40%	100%					
0	28.96 ab	33.73 a	20.89 b	26.14 a	25.02 ab	22.78 b					
3	29.89 ab	37.03 a	23.26 b	32.05 a	31.09 a	31.70 a					
6	31.74 ab	38.16 a	24.37 b	36.54 a	33.36 a	37.13 a					
12	34.16 b	39.92 a	33.69 b	43.38 a	36.64 ab	42.05 ab					
24	41.02 a	41.44 a	51.06 a	49.20 a	42.59 a	42.44 a					

CONTINUA →

48	53.12	b	43.30	c	57.88	a	51.16	b	49.15	bc	51.04	bc
72	58.76	a	52.96	a	61.89	a	52.57	a	57.18	a	54.96	a
Parámetros De Degradabilidad												
a	28.11	ab	34.71	a	17.99	b	26.05	a	27.30	ab	23.91	ab
b	57.61	a	19.95	c	50.77	a	32.33	b	36.86	ab	32.96	ab
a+b	85.73	a	54.66	b	68.76	a	58.38	b	64.16	ab	56.87	b
kd	0.011	a	0.040	a	0.037	a	0.058	a	0.025	a	0.097	a
D2%	48.44	a	44.62	a	49.75	a	46.18	a	46.48	a	46.74	a
D5%	38.47	a	40.69	a	38.80	a	39.93	a	38.67	a	41.24	a
D8%	35.06	a	39.08	a	33.58	a	36.84	a	35.42	a	38.24	a

Nota: abc Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, acorde a las pruebas de Tukey ($p < 0.05$) * 0, 10, 20, 30, 40 y 100 porcentaje de inclusión de mata ratón en la mezcla forrajera (King grass + mata ratón)

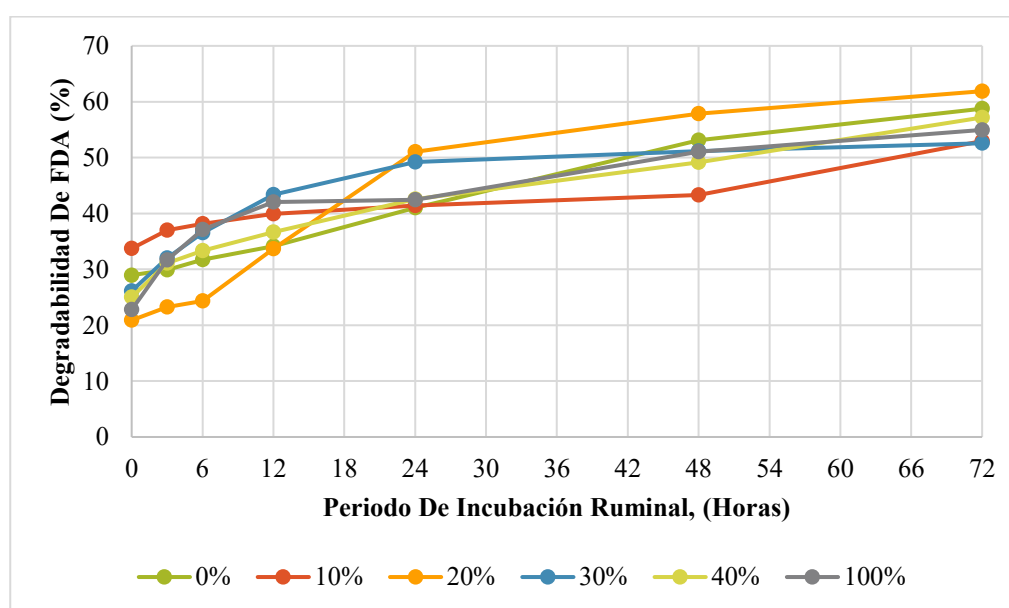


Figura 5. Cambios de la degradabilidad in vitro de la fibra detergente ácido (DIVFDA) del pasto King Grass asociado a niveles de Mata ratón (Glyricidia sepium)

Está ampliamente demostrado que la mayor concentración de los componentes estructurales de la pared celular de las especies forrajeras se relaciona negativamente con las degradabilidad de la dieta, siendo por ello importante conocer el impacto que tiene la inclusión de fuentes vegetales

como las leguminosas; género que generalmente poseen un menor contenido de fibra (Van et al. 2001, Phesatcha y Wanapat, 2016), convirtiéndose esto en un aspecto que puede ser positivo para el ambiente ruminal y el uso de los residuos fibrosos (Phesatcha y Wanapat, 2016) y gramíneas tropicales utilizadas como dieta base (Camero, 2001). En este contexto, en la presente investigación se evaluó el efecto de *Gliricidia sepium* sobre los cambios en la digestibilidad y parámetros de degradación ruminal, observándose que existió un efecto positivo numérico no lineal sobre la DIVFDN con un nivel intermedio (20%) de inclusión dietaria; estos resultados concuerdan con los presentados por Phesatcha y Wanapat (2016), quienes incluyeron niveles incrementales de *Leucaena leucocephala* en dieta base de rastrojo de arroz, y con los reportados por Ash (1990) quien empleó *Gliricidia sepium* en dietas conformadas por *Panicum maximum*. Así mismo, estos autores (Phesatcha y Wanapat, 2016) en comparación con la presente investigación, no encontraron cambios de ningún tipo en la DIVFDA, por efecto del uso de la leguminosa.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y orgánica (DIVMO) se mejoró numéricamente con la adición de hasta 40% de Mata ratón a la dieta basal del pasto King Grass.

No hubo cambios en la degradabilidad *in vitro* de la materia inorgánica (DIVMI) del pasto King grass por efecto de la adición de Mata ratón.

El Mata ratón empleado como 100% de la dieta, presentó la menos DIV de MS, MO, MI, y FDN.

La fracción soluble (a) de la MS presentó el menor valor con la adición de 40% de Mata ratón.

El Mata ratón no provocó cambios en la fracción soluble (a) de la MO

El mayor valor de fracción soluble (a) de la MI, se presentó en el tratamiento con el 20% de adición de Mata ratón.

La menor fracción soluble (a) de la FDN se evidenció con el empleo del 20 y 40% de Mata ratón.

La menor fracción soluble (a) de la FDA se evidenció con el empleo del 20 % de Mata ratón.

No se evidenció efectos lineales de la inclusión de Mata ratón sobre de la fracción potencialmente degradable (b), tasa de degradabilidad (kd) y degradación efectiva del pasto King Grass.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda el empleo de Mata ratón como fuente de suplementación nitrogenada del pasto King Grass hasta un nivel de 20%.

Se deben desarrollar estudios evaluando la degradabilidad *in situ* del pasto King Grass, con la inclusión de Mata ratón y otras fuentes altas en proteínas, pero con una previa cuantificación del contenido de factores anti nutricionales.

Es preciso estudiar el efecto de la adición de Mata ratón a dietas bases de gramíneas tropicales, sobre los cambios en microbiota ruminal y los parámetros de fermentación ruminal.

BIBLIOGRAFIA

- Abaunza MA, L. C. (1991). *Valor nutritivo y aceptabilidad de gramíneas y leguminosas forrajeras tropicales en suelos ácidos*. En *Pasturas Tropicales* (págs. 2-9).
- Adejumo, J., & Ademosun, A. (1985). Effect of plant age at harvest, and of cutting time, frequency and height on the dry matter yield and nutritive value of *Gliricidia sepium* and *Cajanus cajan*. *Journal of Animal Production Research*, 5(1): 1-11.
- Alencar, C. (2007). *Producto de seis gramíneas forrageiras tropicais submetidas a diferentes laminas de agua e doses de nitrogeno*. Minas Gerais.
- Alencar, C., Martins, C., Coser, A., Rocha, W., & Araujo, R. (2009). Irrigação de pastagem: atualidade e recomendações para uso e manejo., *R. Bras. Zootec*, v.38, p.98-108, (supl. especial).
- Atta-Krah, A., & Sumberg, J. (1988). Studies with *Gliricidia sepium* for crop/livestock production systems in West Africa. *Agroforestry Systems*, 6(2): 97-118.
- Basantes, M. (2010). *Producción y Fisiología de cultivos con énfasis en la fertilidad del suelo*. Quito: Union. p.12
- Beuvind, J., & Spoeltra, S. (1994). *In vitro gas production kinetics of grass silages treated with different cell wall degrading enzyme*. 49:277 – 283, 49:277 – 283.
- Chapman, D. (1993). *Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation*. Proceed. XVII International Grasslands Congress., (pp. 95-104.).
- Church, D. (1974). *Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes*. Vol.1 Fisiología Digestiva. Zaragoza (España): Editorial Acribia.
- Colabelli, M. M. (1994). *Relación entre manejo de la defoliación y parámetros de estructura y morfogénesis para gramíneas*. Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Área producción animal.
- Colabelli, M. (1998). *El proceso de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Cone, J., Visscher, G., & Oudshoorn, L. (1996). Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*, 61: 113.

- Costa, C (1994). valoración agronómica de accesiones de *Panicum maximum* en Rondonia. *Pasturas tropicales*, 16 (2): 44-47.
- Davies, A. (1988). *The regrowth of grass swards. In: The grass crop. Ch. 3.* London: M.B. Jones y A. Lazenby (Eds).
- Di Marco, O. (2011). Estimación de la calidad de los forrajes. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 3.
- Doorenbos, J. (1977). Las necesidades de agua de los cultivos. *Riego y Drenaje N° 24*, pp 194.
- FAO. (2006). *Guía para la determinación de los requerimientos hídricos de los cultivos. Estudio en riego y drenaje.* Roma: FAO. Obtenido de www.fao.org/ftp://ftp.fao.org/agl/aglw/docs/idp56s.pdf
- Fox, D., Sniffen, C., O'Connor, J., Russell, J., & Van Soest, P. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III Cattle requirements and diet adequacy. . *Journal of Animal Science.*, 70: 3578 – 3596.
- Goering, H., & Van Soest, P. (1970). Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379. *Agricultural Research Service-USDA, Washington, D.C.*
- Gómez, M., Rodríguez, L., Murguettio, E., Rios, C., Menez, M., Molina, C., Molina, J. (2002). *Árboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente protéica. Centro para la investigación en sistemas sostenibles de producción agropecuaria.*, 13-16.
- Grant, R., & Mertens, D. (1992). Impact of in vitro fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. . *Journal of Dairy Science.* , 75: 1263-1272.
- Groot, J., Cone, J., Williams, B., Debersaques, F., & Lantinga, E. (1996). Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. . *Animal Feed Science and Technology.* , 64: 77-89 .
- Guerrero, P. (2012). *Comportamiento agronómico y valor nutricional de tres pastos de corte King Grass (Pennisetum purpureum x pennisetum thiphoides).* Tesis de grado; UTEQ. , 18-20 .
- Guzmán, J. (1996). *Pastos y Forrajes: producción y aprovechamiento.* . Caracas: Edit. Espasande.
- Herrera, J., & Gonzalez, F. y. (2010). Coeficientes de cultivo (Kc) del King grass para diferentes épocas del año y edad de la planta. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, Vol. 19, núm. 1. pp. 44-49.

- Hodgson, J., Bircham, J., Grant, S., & King, J. (1981). *The influence of cutting and grazing management on herbage growth and utilization*. Proceeding of the British Grassland Society occasional symposium, (págs. 51-61). Nottingham.
- Juárez-Hernández J y Bolaños-Aguilar, E. (2007). *Las curvas de dilución de la proteína como alternativa para la evaluación de pastos tropicales*. *Universidad y Ciencia*. 23 , 1-90.
- Kunth. (1842). *Gliricidia sepium* (Jacq.). *Repertorium Botanices Systematicae.*, 1(4): 679.
- Lemaire, G. (1985). Cinétique de croissance d'un peuplement de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Scrb) pendant l'hiver et le printemps. Effets des facteurs climatiques. *Cinétique de croissance d'un peuplement de fétuque élevée (Festuca arundinacea Scrb) pendant l'hiver et le printemps. Effets des facteurs climatiques*, pp. 96. Caen, Francia: These de Doctorat d'Etat.
- López, S., Carro, M., González, J., & Ovejero, F. (1998). Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. . *Animal Feed Science and Technology.*, 3: 99-113.
- Morales, V. (1994). *Valor nutritivo de gramíneas y leguminosas forrajeras en San Carlos, Costa Rica*. *Pasturas Tropicales* 16 , 27-31.
- Manabí., O. d. (2010). *Estudio de impacto ambiental y plan de manejo ambiental del proyecto de propósito múltiple Chone*. Chone: Gobierno Provincial de Manabi.
- Martinez, P. (2007). Técnicas de riego deficitario en el cultivo de la vid. *Vida Rural* 444, 17-21.
- Melleberge, R. (1970). An. in vitro technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *Journal of Animal Science* , 30: 1005 - 1011.
- Menke, K., & 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.
- Menke, K., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal Agricultural Science.*, 93: 217-222.
- Molina, M. (2001). *Fertilidad de suelos y manejo de la nutrición de cultivos en Costa Rica*. San Jose: Union.

- Oliveira, J. (2007). *Producto de duas gramíneas tropicais submetidas a diferentes lâminas de agua e doses de nitrogênio e potássio no Estado do Tocantins*. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) (pág. 121). Vicosa: Universidade Federal de Vicosa.
- Pachacama, V. (2012). *Evaluación de cuatro láminas de agua de riego en el manejo del cultivo de frejol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) variedad cargabello, en Guayallabamba*. Sangolqui: Tesis. Ing. Agropecuario.
- Posada, S., & Noguera, R. (2005). *Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes*. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Animales- GRICA, AA 1226.
- Proaño, M. (2004). *Cálculo de la evaporación – Método de la Tina. Proyecto "Estudio de métodos de manejo y control del riego en los principales cultivos de la Península de Santa Elena*. Guayaquil: Universidad Agraria del Ecuador.
- Rodríguez, T. y. (2000). *Aspectos nutricionales a considerar en el manejo de algunas gramíneas forrajeras en los Llanos Orientales de Venezuela*. FONAIAP-CIAE Anzoátegui, Barcelona. Publicación especial N° 38, 188.
- Theodorou, M., Williams, B., Dhanoa, M., McAllan, A., & 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: 185-197.
- Tilley, J., & Terry, R. (1963). A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18: 104-111.
- Tituaña, A. (2012). *Evaluación de la producción del pasto King grass (Pennisetum purpureum x pennisetum thipoides), con abonos orgánicos*. Tesis de grado; UTEQ., 3-4.
- Tobal, C. (1999). *Evaluación de los alimentos a través de los diferentes métodos de digestibilidad*. 108-114.
- Urbano, D., Dávila, C., & Moreno, P. (2004). Matarratón, un árbol de gran potencial. *Iniap. Divulga*, 1. 9-10.
- Van Soest, P. (1964). Development of a comprehensive system of feed analyse and its application to forages. *Journal Animal Science*, 26:119-128.
- Velasco ZME, H.-G. A. (2001). *Curva de crecimiento y acumulación estacional del pasto Ovillo (Dactylis glomerata L.)*. *Téc Pecú Méx* 39, 1-14.