

Degradabilidad y producción de metano *in vitro* del follaje de árboles y arbustos con potencial en la nutrición de rumiantes

Degradability and *in vitro* methane production of tree and shrub foliage with potential in ruminant nutrition

Genesis Ester Pérez-Can¹, Magnolia Tzec-Gamboa², Samuel Albores-Moreno³, José Sanginés-García¹, Edgar Aguilar-Urquizo¹, Alfonso Chay-Canul⁴, Jorge Canul-Solis⁵, Juan Muñoz-Gonzalez⁶, Victor Diaz-Echeverría⁷, Angel Trinidad Piñero-Vázquez^{1*}

¹Tecnológico Nacional de México/I.T. Conkal. Avenida Tecnológico Mérida, Yucatán México. C.P. 97345.

*Correo electrónico: pineiroiamc@gmail.com

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.

³El colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Campeche, México

⁴División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México

⁵Tecnológico Nacional de México/I.T. Tizimín. División de Estudios de Posgrado e Investigación, Yucatán, México.

⁶Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad Maya de Estudios Agropecuarios, Chiapas, México.

⁷Tecnológico Nacional de México/I. T. Zona Maya, Quintana Roo, Mexico.

*Autor de correspondencia

Resumen

El objetivo del estudio fue determinar el valor nutritivo, la fermentación ruminal y la producción de metano *in vitro* del follaje de especies arbóreas y arbustivas con potencial forrajero como estrategias de alimentación en época de secas y mitigación de las emisiones de metano. El líquido ruminal fue extraído por medio de una sonda esofágica. Se utilizó un diseño en bloques repetidos en el tiempo. El contenido de proteína cruda (PC) y fibra detergente neutro y ácido fluctuaron de 6.14% a 21.78%, 44.34% a 77.43% y 16.12% a 49.53% de materia seca (MS). No se encontró diferencia en el volumen máximo de gas ($p > 0.05$). La degradabilidad fue diferente, observando la mejor en *Tithonia diversifolia* (760.40 g/kg de MS), *Morus alba* (800.66 g/kg de MS) y *Hibiscus rosa-sinensis* (800.16 g/kg de MS), mientras que la más baja fue *Megathyrsus maximus* (390.40 g/kg de MS y 287.40 g/kg de materia orgánica (MO)) ($p < 0.05$). No se observó diferencia en la producción de metano (CH₄) ($p > 0.05$). Se concluye que *L. leucocephala*, *P. piscipula*, *B. alicastrum* y *G. ulmifolia*, *T. diversifolia* y *M. alba* tienen un alto potencial para ser incluidos en la dieta de rumiantes como fuentes de proteína en época de secas y estrategias para mitigar las emisiones de metano.

Palabras clave: Metano; metabolitos secundarios; mitigación; trópico.

Abstract

The objective of the study was to determine the nutritional value, ruminal fermentation, and *in vitro* methane production of foliage of tree and shrubs species with forage potential as feeding strategies in dry season and mitigation of methane emissions. The rumen liquor was taken by an esophageal tube. A repeated block design overtime was used. The content of crude protein (CP) and neutral and acid detergent fiber ranged from 6.14% to 21.78%, 44.34% to 77.43% and 16.12% to 49.53% of dry matter (DM). No difference was found in the maximum volume of gas ($p > 0.05$). The degradability was different among species, and it was higher for *Tithonia diversifolia* (760.40 g/kg DM), *Morus alba* (800.66 g/kg DM) and *Hibiscus rosa-sinensis* (800.16 g/kg DM), whilst the lower was for *Megathyrsus maximus* (390.40 g/kg DM and 287.40 g/kg organic matter (OM)) ($p < 0.05$). No difference in methane (CH₄) production was observed ($p > 0.05$). It is concluded that *L. leucocephala*, *P. piscipula*, *B. alicastrum* and *G. ulmifolia*, *T. diversifolia*, and *M. alba* have a high potential to be included in the ruminant diet as sources of protein in the dry season and strategies to mitigate methane emissions.

Keywords: Methane; secondary metabolites; mitigation; tropics.

Recibido: 13 de febrero de 2020

Aceptado: 5 de junio de 2020

Publicado: 24 de junio de 2020

Como citar: Pérez-Can, G. E., Tzec-Gamboa, M., Albores-Moreno, S., Sanginés-García, J., Aguilar-Urquizo, E., Chay-Canul, A., Canul-Solis, J., Muñoz-Gonzalez, J., Diaz-Echeverría, V., & Piñero-Vázquez, A. T. (2020). Degradabilidad y producción de metano *in vitro* del follaje de árboles y arbustos con potencial en la nutrición de rumiantes. *Acta Universitaria* 30, e2840. doi. <http://doi.org/10.15174/au.2020.2840>

Introducción

El calentamiento global y el cambio climático representan un problema mundial que afecta la seguridad alimentaria y el bienestar de algunos sectores más vulnerables de la población humana. Esta problemática es influenciada por el incremento de gases de efecto invernadero (GEI), como el dióxido de carbono, metano y óxido nitroso, procedentes de actividades antropogénicas (United Nations [UN], 2012). En este sentido, el metano (CH₄) es uno de los principales GEI (Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2006), el cual es un subproducto de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos, y es producido por los rumiantes, donde las arqueas metanogénicas y los protozoarios ruminales tienen una función importante en la síntesis de este gas. Estos microorganismos utilizan el bióxido de carbono (CO₂) y el hidrógeno (H₂) que se origina a partir de la síntesis de los ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV), que son producto de la fermentación microbiana de los carbohidratos contenidos en los follajes y granos (Martin, Morgavi & Doreau, 2010; Poppi & McLennan, 1995). Principalmente, las archaeas metanogénicas utilizan el H₂ metabólico y el CO₂ para formar CH₄ y así reducir la acumulación de H₂ en el rumen (Benaouda, Gonzáles, Molina & Castelán, 2017). En la actualidad, la ganadería emite el 18% de este gas y la fermentación ruminal contribuye con el 39.1% de las emisiones producidas por las actividades ganaderas (Gerber *et al.*, 2013). Diversos autores mencionan que los rumiantes alimentados con pasturas tropicales que contienen altas concentraciones de fibra (> 70%) y baja calidad (bajo contenido de proteína cruda [PC] y digestibilidad), además de ser escasas en la mayor parte del año, conllevan a una mayor producción de CH₄ (Kurihara, Magner, Hunter & McCrabb, 1999; Melesse, Steingass, Schollenberger, Holstein & Rodehutschord, 2017), debido al bajo aporte de proteína, minerales y energía al rumen. La elevada producción de CH₄ representa una pérdida de la energía bruta consumida, la cual puede llegar hasta el 12% (Johnson & Johnson, 1995). Por lo tanto, contribuir a mitigar los efectos de CH₄ se ha reconocido como un objetivo importante para combatir el cambio climático y, por otro lado, para incrementar los beneficios económicos a los ganaderos al mejorar la eficiencia en la utilización de la energía. En este sentido, el uso de alimentos balanceados mejora la eficiencia productiva y reduce las emisiones de GEI (Benaouda *et al.*, 2017); sin embargo, los alimentos balanceados empleados en la nutrición de rumiantes como estrategia de suplementación durante la época de secas y formulados a base de granos afectan la seguridad alimentaria, lo que provoca que sean comercializados a precios elevados y, por lo tanto, que la rentabilidad de los sistemas de producción sea menor (Castañeda-Serrano, Piñeros-Varón & Vélez-Giraldo, 2017).

Durante la época de secas y lluvias, la vegetación tropical secundaria representa una abundante fuente de biomasa y proteína para los rumiantes (Ventura-Cordero, González-Pech, Torres-Acosta, Sandoval-Castro & Tun-Garrido, 2017), con potencial forrajero y capacidad para mitigar las emisiones de CH₄ entérico, por su contenido de taninos condensados y saponinas (Piñero-Vázquez *et al.*, 2018). Esta vegetación tropical secundaria (follajes, frutos, flores y vejucos) representa una fuente de PC para la dieta de rumiantes debido a que su contenido proteico y mineral es superior a la de los pastos tropicales. Entre estas especies, las leguminosas han demostrado potencial como estrategia nutricional en el trópico, principalmente en periodos de escases de alimento, puesto que tienen un alto contenido de proteína, el cual varía de 140 g/kg a 240 g/kg de materia seca (MS) (Castañeda-Serrano *et al.*, 2017). Estudios como los de Woodward, Waghorn, Lassey & Laboyrie (2002), Hess *et al.* (2003) y Animut *et al.* (2008) han demostrado que las arbóreas que contienen taninos condensados (TC) reducen las emisiones de CH₄. En este sentido, es importante evaluar alternativas forrajeras que tengan la capacidad de reducir las emisiones de GEI sin afectar la digestibilidad y que mejoren el comportamiento productivo de los rumiantes en las épocas de escaso alimento. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el potencial nutritivo, el efecto sobre la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro* de follajes arbóreas y arbustivas con potencial forrajero en la región tropical de México.

Materiales y métodos

Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, ubicada al este del municipio de Conkal (21°, 05', N; 89°, 32', O, con una altitud de 9 msnm).

Muestreo de arbóreas forrajeras

Se recolectaron hojas frescas de *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia*, *Leucaena leucocephala*, *Morus alba*, *Tithonia diversifolia*, *Brosimum alicastrum*, *Cynodon nlemfluensis*, *Megathyrsus maximus*, *Piscidia piscipula* y *Hibiscus rosa-sinensis*. Posteriormente, el material fue secado en una estufa de aire forzado a 55 °C hasta obtener un peso constante y fueron molidas a un tamaño de partícula de 1 mm en un molino (Azteca, Monterrey, Nuevo León, México), previo al análisis químico.

La recolección de follaje se realizó en los meses de junio y agosto de 2018, en la región central de Conkal, Yucatán, México. Esta región tiene un clima cálido subhúmedo con precipitaciones regulares en el verano (mayo-agosto), una temperatura promedio anual de 26 °C, precipitaciones de 984.4 mm y fluctuaciones de humedad relativa del 66% al 89% (García, 1981). Los suelos son calcáreos, poco profundos y con altos porcentajes de rocas llamados litosol (*tzek'el* en lengua maya) (Duch, 1988). La vegetación es de baja densidad y los arbustos alcanzan entre 4 m y 7 m de altura. El área selvática de la región se caracteriza por una selva baja caducifolia (Gutiérrez-Báez & Zamora-Crescencio, 2012).

Análisis químico

Las muestras recolectadas del follaje fueron molidas a través de un tamiz de 1 mm para su análisis, según la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (1990). El contenido de materia seca (MS) del forraje se determinó en una estufa de aire forzado a 57 °C durante 48 h (peso constante). Las determinaciones de nitrógeno (PC = N × 6.25) se llevaron a cabo con un LECO® CN2000 series 3740 (LECO® Corp., St. Joseph, MI) (AOAC, método número 992.15). El contenido de materia orgánica (MO) de las muestras se determinó por combustión en una mufla a 550 °C (AOAC, método número 923.03), y la concentración de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente acida (FDA) se determinó según lo sugerido por Van Soest, Robertson & Lewis (1991). La concentración de TC se determinó según lo sugerido por Terriñ, Rowan, Douglas & Barry (1992). El contenido de saponinas (Sa) se determinó según lo sugiere Makkar (2006).

Animales y muestreo de líquido de rumen

Se utilizaron cuatro ovinos de pelo con un peso vivo promedio (PV) de 31 kg ± 1 kg, con una edad de siete meses como donadores de líquido ruminal. Los animales fueron alimentados dos veces al día por un periodo de dos meses con una dieta basada en 60% de forraje y 40% de concentrado y un contenido de proteína cruda de 16% kg/MS; adicionalmente, se proporcionó sal mineral y agua a libre acceso. El líquido ruminal fue tomado antes de la alimentación, el cual se extrajo mediante sonda esofágica (Ramos-Morales *et al.*, 2014), posteriormente se colocó en un termo hermético a 39 °C en condiciones anaeróbicas y se transportó hasta el laboratorio para luego ser filtrado con gasas dobles.

Producción de gas *in vitro*

La producción de gas se determinó mediante el procedimiento sugerido por Menke & Stengass (1988) y modificado por Makkar, Blümmel & Becker (1995). Se colocó 1 g de materia seca (MS) de cada forraje molido a un tamaño de partícula de 1 mm en frascos de vidrio color ámbar de 120 mL. Después, se adicionaron 90

mL de inóculo ruminal mezclado en una relación 1:9, con una solución mineral reducida según el método propuesto por Menke & Stengass (1988). Conforme se agregó el inóculo, el flujo continuo de CO₂ fue constante con la finalidad de mantener las condiciones de anaerobiosis. El flujo de CO₂ se retiró y se colocó un tapón de goma y un arillo de aluminio para sellar los frascos a presión. El aire del interior de cada frasco se extrajo hasta igualar la presión interior a cero e inmediatamente después fueron colocados en un baño maría a una temperatura constante de 39 °C. Los datos fueron corregidos con base a los blancos incubados bajo las mismas condiciones, con la diferencia de que no contenían sustrato de las arbóreas o arbustivas.

La presión de gas generada por la fermentación del sustrato se midió con un manómetro con escala de 0 kg/cm⁻² a 1 kg/cm⁻² con aguja hipodérmica. En cada medición se extrajo el gas hasta bajar la presión interior nuevamente a 0. Las lecturas se realizaron a las 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h, 60 h y 72 h de incubación y se transformó en volumen de gas utilizando la siguiente ecuación de regresión logística: $V = (P + 0.019) (0.024)^{-1}$ (Elmasry *et al.*, 2016), donde V = volumen de gas producido y P = presión que se genera en cada botella.

Cinética de fermentación de gases *in vitro* y fracciones fermentables.

El volumen máximo (V_m, mL g⁻¹), la tasa de fermentación (S, h⁻¹) y la fase lag (L, h) de la producción de gas se estimaron en el PROC GLM del *statistical analysis software* (SAS, 2008) utilizando el siguiente modelo logístico: $V = V_m / (1 + e^{(2 - 4S(t - L)})$ (Pell & Schofield, 1993), donde V = volumen de gas en el momento (t), V_m = volumen máximo de gas, S = velocidad de fermentación específica (similar a la tasa de degradación) y L = tiempo de colonización de microorganismos. También se obtuvieron volúmenes acumulados de gas para los intervalos de tiempo de 0 h a 8 h (V_{f0-8}), de 8 h a 24 h (V_{f8-24}) y de 24 h a 72 h (V_{f24-72}) de incubación. Estos volúmenes se utilizaron para estimar las fracciones (mg/g⁻¹MS incubada) de fermentación rápida (FR), fermentación media (FM) y fermentación lenta (FL), según las ecuaciones de regresión lineal propuestas por Miranda, Vázquez, Améndola, Sandoval & González (2015): FR = V_{f0-8}/0.427; FM = V_{f8-24}/0.615; y FL = V_{f24-72}/0.345. La suma de las tres fracciones es la fracción fermentable total (FT).

Degradabilidad *in vitro* de materia seca y materia orgánica.

Después del periodo de incubación de los sustratos experimentales (72 h), los residuos de cada sustrato se recolectaron filtrándolos a través de bolsitas de dacrón (10 cm x 4 cm). La degradabilidad *in vitro* de la MS (DEGMS) se estimó secando el material residual a 55 °C hasta lograr peso constante. La degradabilidad *in vitro* de la MO (DEGMO) se estimó por combustión en una mufla a 550 °C (AOAC 1980, método número 923.03). Posteriormente, el DEGMS (%) se calculó basándose en la MS inicial y residual (Monforte-Briceño, Sandoval-Castro, Ramírez-Avilés & Capetillo, 2005) y la DEGMO (%) se calculó de manera similar basándose en la MO inicial y residual (Miranda *et al.*, 2015).

Producción de metano

La producción total de gas durante 24 h de fermentación se midió con una jeringa de vidrio (Becton Dickinson BD Luer) a las 6 h, 12 h, 18 h y 24 h de incubación. Todas las muestras fueron depositadas en botellas de vidrio de 25 mL, cerradas herméticamente con tapones de goma y anillos de aluminio. En cada botella se depositaron 25 mL de una solución salina saturada (1 L de agua por 1 kg de cloruro de sodio [NaCl]) en una proporción de 1:1 para formar una trampa y mantener las propiedades del gas. Todas las muestras fueron analizadas para determinar la concentración de CH₄ a través de un cromatografo de gases marca *Aligent Technology* 7890B, modelo G3440B, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna (HP-5) de 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm. Se inyectaron 5 mL de gas con una jeringa de 60 mL a una temperatura de 60 °C y una velocidad de acarreo de 80 mL min⁻¹ usando helio como gas transportador (Bhatta, Saravanan, Baruah & Prasad, 2015; Kajikawa, Tajima, Mitsumori & Takenaka, 2007).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se analizaron las variables de fermentación *in vitro* y digestibilidad (Vm, S, L, RF, MF, LF, DEGMS, DEGMO) y producción de CH₄, utilizando un diseño experimental en bloque con repeticiones en el tiempo, en el que cada tratamiento tuvo ocho repeticiones. Los datos fueron analizados en base a (Cochran & Cox, 1990) un modelo lineal general mediante con el procedimiento PROC ANOVA del SAS® 9.2 software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2008). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se utilizó el siguiente modelo matemático: $Y_{ij} = \mu + \eta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$ (Montgomery, 2013).

donde:

Y_{ij} = puntuación del sujeto i bajo tratamiento j

μ = promedio global de todos los datos experimentales

$\eta_i = \mu_i - \mu$ = efecto asociado al bloque i

$\alpha_j = \mu_j - \mu$ = efecto del tratamiento j

ε_{ij} = error experimental asociado con el sujeto i bajo tratamiento j .

Resultados

Composición química

La composición química del follaje de las arbóreas y arbustivas se presenta en la tabla 1. El contenido de PC más alta se registró en *G. sepium* (21.78%), seguida de *T. diversifolia* (21.76%) y *L. leucocephala* (21.37%), y el contenido de PC más bajo fue en el pasto *M. maximus* (6.14%). Los contenidos de FDN y FDA variaron de 44.34% a 77.43% y de 16.12% a 49.53% de la MS en las diferentes especies. La concentración de TC de *L. leucocephala* fue mayor (1.16% de la MS), mientras que en *G. sepium* la concentración fue menor (0.08% de MS). Las especies *P. piscipula* y *G. ulmifolia* obtuvieron mayor contenido de Sa (0.90% y 0.91% de la MS), y las especies *T. diversifolia*, *H. rosa-sinensis*, *M. maximus* y *B. alicastrum* obtuvieron menor concentración en el rango de 0.09% a 0.07% de MS (tabla 2).

Tabla 1. Composición química del follaje de las arbóreas y arbustivas (% de la MS).

Especies	MS	MO	PC	EE	FDN	FDA
<i>Guazuma ulmifolia</i>	45.51	5.60	13.23	3.30	61.78	45.29
<i>Brosimum alicastrum</i>	42.05	4.57	14.14	2.50	52.02	38.37
<i>Leucaena leucocephala</i>	37.41	3.33	21.37	5.07	59.52	32.42
<i>Piscidia piscipula</i>	35.19	3.86	12.91	2.76	58.90	43.33
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	30.89	2.16	14.66	2.81	71.88	36.88
<i>Gliricidia sepium</i>	26.44	3.32	21.78	4.74	53.33	27.21
<i>Megathyrus maximus</i>	24.21	2.29	6.14	7.85	77.43	49.53
<i>Morus alba</i>	22.48	3.01	16.94	4.54	44.34	27.90
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	21.97	2.67	14.02	4.51	51.94	16.12
<i>Tithonia diversifolia</i>	16.48	3.06	21.76	4.84	50.65	36.80

MS: Materia seca; MO: Materia orgánica; PC: Proteína cruda; EE: Extracto eterio; FDN: Fibra detergente neutra; FDA: Fibra detergente ácida. F: forraje; M: madera; CV: Cercas vivas; G: gastronomía; L: leña; SSP: Sistemas silvopastoriles; BB: banco de biomasa; MD: medicinal; O: ornamental.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Contenido de taninos condensados y saponinas en el follaje de arbóreas y arbustivas (% de la MS).

Especies	TC (% de la MS)	SAP (% de la MS)	Tipo de crecimiento
<i>Guazuma ulmifolia</i>	0.47	0.91	Arbustiva
<i>Brosimum alicastrum</i>	0.22	0.07	Arbustiva
<i>Leucaena leucocephala</i>	1.16	0.43	Arbustiva
<i>Piscidia piscipula</i>	0.19	0.90	Arbustiva
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	0.11	0.13	Pasto
<i>Gliricidia sepium</i>	0.08	0.12	Arbustiva
<i>Megathyrsus maximus</i>	0.15	0.09	Pasto
<i>Morus alba</i>	0.13	0.15	Arbustiva
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	0.13	0.09	Arbustiva
<i>Tithonia diversifolia</i>	0.12	0.09	Arbustiva

TC: taninos condensados; Sap: saponinas totales.
Fuente: Elaboración propia.

Cinética de fermentación de gas *in vitro* y volúmenes fraccionales

El volumen máximo (V_m) y la tasa de fermentación (S) fue similar entre las especies incubadas ($p > 0.05$). Los V_m más altos se encontraron en *T. diversifolia* y *B. alicastrum* (348.40 y 373.81 mL/g de MS incubado, respectivamente) (figura 1), mientras que los V_m similares fueron encontrados en *H. rosa-sinensis*, *C. nlemfuensis*, *M. alba*, *G. sepium*, *L. leucocephala* y *M. maximus* (305.21, 319.72, 333.57, 338.99, 336.25 y 348.89 mL/g de MS incubada). Los V_m más bajos fueron observados en *G. ulmifolia* y *P. piscipula* (234.06 y 304.97 mL/g de MS incubada). La tasa más alta de fermentación se registró en *H. rosa-sinensis* (0.04 h^{-1}). Mientras tanto, *T. diversifolia*, *M. maximus*, *C. nlemfuensis*, *G. sepium*, *P. piscipula*, *L. leucocephala*, *G. ulmifolia* y *M. alba* tuvieron una S similar, observando un promedio de 0.03 h^{-1} ($p > 0.05$). La tasa más baja la obtuvo *B. alicastrum* (0.02 h^{-1}). Finalmente *C. nlemfuensis* y *M. maximus* requirieron más tiempo (L) para iniciar la fermentación (de 6.46 h a 7.50 h) con respecto a *P. piscipula*, *L. leucocephala*, *M. alba*, *G. ulmifolia* y *G. sepium* (de 0.55 h a 3.92 h). La *T. diversifolia*, *H. rosa-sinensis* y *B. alicastrum* obtuvieron valores similares en la fase lag (4.72 h, 5.20 h y 5.27 h) y menores que *C. nlemfuensis* y *M. maximus* ($p > 0.05$). No se observaron diferencias en el volumen fraccional fermentable de la MS de los diferentes sustratos incubados ($p > 0.05$). La fracción más alta de FR (V_{0-8}) se encontró en *P. piscipula* (100.96 mL/g de MS incubado); por otro lado, la fracción fermentable fue similar entre *G. sepium*, *M. alba* y *L. leucocephala* (83.69, 89.86 y 91.09 mL/g de MS incubado), *H. rosa-sinensis* y *T. diversifolia* (72.17 y 78.75 mL/g de MS) y *C. nlemfuensis* y *B. alicastrum* (61.48 y 68.07 mL/g de MS incubado) ($p > 0.05$). La fracción más baja de FR se encontró en *G. ulmifolia* y *M. maximus* (56.14 a 56.55 mg/g de MS incubado). Con respecto a FM (V_{8-24}), *G. sepium* y *H. rosa-sinensis* tuvieron la mayor fracción (104.66 y 107.80 mL/g de MS incubado, respectivamente), seguidos por *P. piscipula*, *M. alba*, *L. leucocephala*, *T. diversifolia*, *B. alicastrum*, *C. nlemfuensis* y *M. maximus* (79.28 mL/g, 83.84 mL/g, 88.97 mL/g, 94.11 mL/g, 96.67 mL/g, 98.96 mL/g y 99.53 mL/g de MS incubado, respectivamente).

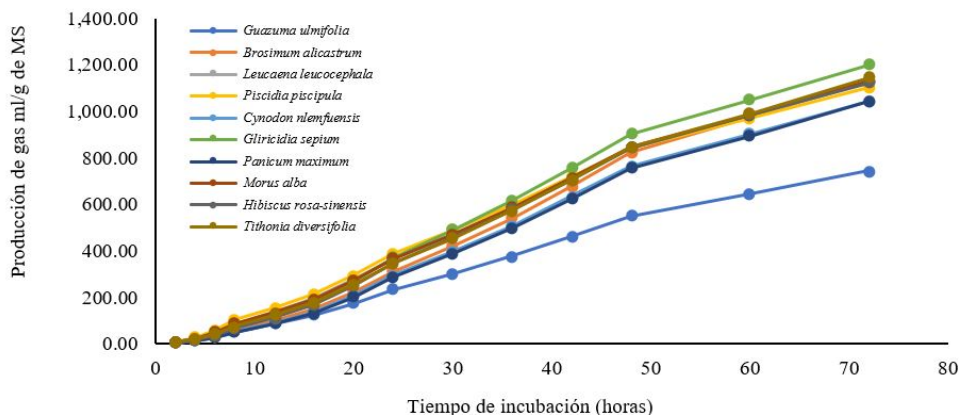


Figura 1. Producción de gas *in vitro* del follaje de arbóreas arbustivas durante 72 h de incubación.
Fuente: Elaboración propia.

La fracción más baja de FM se encontró en *G. ulmifolia* (56.75 ml/g de MS incubado). En la FL (V_{24-72}), *T. diversifolia*, *M. maximus* y *B. alicastrum* tuvieron la mayor fracción (172.54, 192.81 y 209.07 ml/g de MS incubado, respectivamente) y los *G. sepium*, *M. alba*, *C. nlemfuensis* y *L. leucocephala* fueron similares (150.64 ml/g, 154.71 ml/g, 159.28 ml/g, 161.31 ml/g de MS) ($p > 0.05$). La fracción más baja de FL se encontró en *H. rosa-sinensis* (125.24 ml/g de MS), *P. piscipula* (124.73 ml/g de MS) y *G. ulmifolia* (121.18 ml/g de MS) (tabla 3).

Tabla 1. Parámetros de la producción de gas total y volúmenes fraccionales en el follaje de arbóreas arbustivas.

Especies	Parámetros				Volúmenes fraccionales (ml g ⁻¹ MS)		
	EM (MJ/kg)	V _m (ml g ⁻¹ MS)	S (ml h ⁻¹)	L (h)	V ₀₋₈	V ₈₋₂₄	V ₂₄₋₇₂
<i>G. ulmifolia</i>	9.07	234.06	0.03	2.97 ^c	56.14	56.75	121.18
<i>B. alicastrum</i>	16.47	373.81	0.02	5.27 ^b	68.06	96.67	209.07
<i>L. leucocephala</i>	14.09	336.25	0.03	1.84 ^d	91.09	83.84	161.31
<i>P. piscipula</i>	12.81	304.97	0.03	0.55 ^e	100.96	79.28	124.73
<i>C. nlemfuensis</i>	14.07	319.72	0.03	6.46 ^a	61.48	98.96	159.28
<i>G. sepium</i>	15.91	338.99	0.03	3.92 ^c	83.69	104.66	150.64
<i>M. maximus</i>	14.94	348.89	0.03	7.50 ^a	56.55	99.53	192.81
<i>M. alba</i>	14.65	333.54	0.03	1.85 ^d	89.86	88.97	154.71
<i>H. rosa-sinensis</i>	14.41	305.21	0.04	5.20 ^b	72.17	107.80	125.24
<i>T. diversifolia</i>	16.38	348.40	0.03	4.72 ^b	78.75	94.11	175.54
Valor de <i>p</i>	0.305	0.584	0.158	0.001	0.075	0.132	0.529
EEM	3.806	41.474	0.004	1.000	11.296	11.705	30.854

V_m: Volumen máximo de gas; S: tasa de producción de gas; L: Fase lag; V₀₋₈: Volumen fraccional en la fracción rápidamente fermentable (0 h-8 h); V₈₋₂₄: Volumen fraccional de gas en la fracción media (8 h-24 h); V₂₄₋₇₂: Volumen fraccional de gas en la fracción de lenta fermentación (24 h-72 h); EEM: error estándar de la media. Letras distintas en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia.

Producción de CH₄ ruminal y degradabilidad de la materia seca y orgánica

La producción de CH₄ fue similar entre follajes incubados ($p < 0.05$). Sin embargo, se observó una menor emisión en *L. leucocephala* (14.4 ml/g MS incubada) con respecto a *T. diversifolia*, *P. piscipula*, *M. alba*, *B. alicastrum*, *M. maximus* y *G. ulmifolia* (20.17, 27.26, 32.11, 32.30, 34.00 y 34.06 ml/g MS incubado, respectivamente), mientras que las especies con mayor producción fueron *C. nlemfuensis*, *G. sepium* y *H.*

rosa-sinensis (37.60 ml/g, 40.49 ml/g y 47.64 ml/g MS incubado) (tabla 4). Se encontraron diferencias entre los follajes para DEGMS y DEGMO ($p < 0.05$). La DEGMS más alta ($p < 0.05$) se encontró en *G. sepium*, *T. diversifolia*, *M. alba* y *H. rosa-sinensis* (610.33, 760.40, 800.16 y 800.66 g/kg de MS). Se registró una DEGMS menor para *B. alicastrum*, *C. nlemfuensis*, *G. ulmifolia*, *L. leucocephala* y *P. piscipula* (550.90 g/kg, 490.33 g/kg, 470.00 g/kg, 450.56 g/kg, 400.63 g/kg de MS), mientras que la más baja se registró en *M. maximus* (390.40 g/kg de MS). Los valores más altos de DEGMO ($p < 0.05$) se encontraron en *T. diversifolia*, *M. alba* y *H. rosa-sinensis* (698.90 g/kg, 762.30 g/kg y 766.70 g/kg de MO, respectivamente), seguidos de *G. sepium*, *B. alicastrum*, *C. nlemfuensis* y *G. ulmifolia* (542.00, 482.30, 408.00 y 388.90 g/kg de MO, respectivamente). La *L. leucocephala*, *P. piscipula* y *M. maximus* tuvieron una DEGMO menor (366.70 g/kg, 306.40 g/kg y 287.40 g/kg de MO, respectivamente) (tabla 4).

Tabla 2. Producción de metano y degradabilidad *in vitro* del follaje de especies arbóreas.

Especies	CH ₄ (ml/g MS)	DEGMS (g/kg de MS)	DEGMO (g/kg de MS)
<i>Guazuma ulmifolia</i>	34.06	470.00 ^c	388.90 ^c
<i>Brosimum alicastrum</i>	32.30	550.90 ^c	482.30 ^c
<i>Leucaena leucocephala</i>	14.47	450.56 ^c	366.70 ^d
<i>Piscidia piscipula</i>	32.11	400.63 ^d	306.40 ^d
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	37.70	490.33 ^c	408.00 ^c
<i>Gliricidia sepium</i>	40.49	610.33 ^b	542.00 ^b
<i>Megathyrus maximus</i>	34.00	390.40 ^d	287.40 ^d
<i>Morus alba</i>	27.26	800.16 ^a	762.30 ^a
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	47.64	800.66 ^a	766.70 ^a
<i>Tithonia diversifolia</i>	20.17	760.40 ^b	698.90 ^b
EEM	9.58	30.70	43.70
Valor de P	0.5374	0.0001	0.0001

CH₄: Metano; DEGMS: Degradabilidad *in vitro* de la materia seca; DEGMO: degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica; EEM: error estándar de la media. Letras distintas en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Composición química

La mayoría de las especies arbóreas tienen un alto contenido de PC y son bajas en fibra a diferencia de *C. nlemfuensis* y *M. maximus*, gramíneas que contienen una menor concentración de PC y mayor concentración de carbohidratos estructurales (Archimède *et al.*, 2011; Kennedy & Charmley, 2012). Estos factores reducen la digestibilidad y la fermentación ruminal, afectando la tasa de pasaje y el tiempo de degradación en el rumen (Piñero-Vázquez *et al.*, 2018). En este estudio, tres de las diez especies mostraron alto contenido de PC, *G. sepium* (210.7 g/kg de MS), *T. diversifolia* (217.6 g/kg de MS) y *L. leucocephala* (213.7 g/kg de MS), estos valores son similares a los reportados por Soltan *et al.* (2013) y Vite *et al.* (2019). Sin embargo, los valores de FDN y FDA son más altos que lo reportado por los mismos autores. Estas variaciones podrían explicarse por la edad de la planta, época del año y tipo de suelo donde se encontraban las plantas; cabe mencionar que los datos de FDN y FDA son similares a los reportados por Albores-Moreno *et al.* (2018).

Todas las especies presentaron cantidades moderadas de TC y Sa (tabla 2), esto varía ampliamente dependiendo de las especies de plantas. El contenido de TC y Sa puede afectar la digestión y el uso de nutrientes en rumiantes debido a la reducción de microorganismos en el rumen (Patra *et al.*, 2017), como pudo haber sido el caso de *P. piscipula*, *G. ulmifolia* y *L. leucocephala*; ya que son las tres arbóreas que obtuvieron mayor concentración en TC (0.19%, 0.47% y 1.16% de la MS) y Sa (0.90%, 0.91% y 0.43% de MS). El contenido

de TC de *L. leucocephala* es similar a lo reportado por Soltan *et al.* (2013). Melesse *et al.* (2017) realizaron pruebas cualitativas del tamizaje fitoquímico de estos árboles y arbustos donde observaron moderada presencia de TC y Sa, comparables a lo reportado en este estudio.

Cinética de fermentación de gas *in vitro* y volúmenes fraccionales

El efecto de los TC y Sa en la digestión de rumiantes se refleja en la cinética de fermentación y en la producción de gas *in vitro*. En este estudio, es posible que el contenido de TC en las especies de *P. piscipula*, *G. ulmifolia* y *L. leucocephala* (0.19%, 0.47% y 1.16% de MS, respectivamente) y el contenido de Sa (0.43%, 0.90% y 0.91% de MS, respectivamente) resultaran en una baja producción total de gas (Vm) con respecto a *T. diversifolia*, *M. maximus* y *B. alicastrum*. Esto se debe a que los TC son capaces de inhibir o modular la actividad enzimática y microbiana en la MO (Patra *et al.*, 2017), lo que provoca una reducción en la fermentación (Bhatta *et al.*, 2015; Puchala *et al.*, 2012). Resultados similares fueron reportados por Tan *et al.* (2011), quienes evaluaron la inclusión de TC de *L. leucocephala* en una dieta para rumiantes (incubando 10.0 mg, 15.0 mg, 20.0 mg, 25.0 mg y 30.0 mg en 0.500 g), observando una reducción en la tasa de fermentación (0.0002 h⁻¹ a 0.0176 h⁻¹) y una menor producción total de gas (86.4 ml g⁻¹ a 49.8 ml g⁻¹ de MS incubada). Diversos autores indican que la mayor producción de gas acumulado encontrada en las especies *M. maximus*, *G. sepium*, *T. diversifolia* y *B. alicastrum* (tabla 3) está relacionada con su menor contenido de TC (0.08%, 0.12% y 0.22% de MS) y Sa (0.12%, 0.09% y 0.07% de MS) (Albores-Moreno *et al.*, 2018).

Producción de metano entérico y degradabilidad de la materia seca y orgánica

Las plantas con mayor potencial para mitigar CH₄ fueron *L. leucocephala*, *T. diversifolia*, *P. piscipula*, *M. alba*, *B. alicastrum*, *M. maximus* y *G. ulmifolia* (20.17, 27.26, 32.11, 32.30, 34.00 y 34.06 ml/g MS incubado); ya que emitieron menos CH₄ (tabla 4). La reducción en la producción de CH₄ en la *L. leucocephala*, *P. piscipula*, *B. alicastrum* y *G. ulmifolia* está asociada con el mayor contenido de TC y Sa (tabla 2), debido a que tiene efecto directo sobre los metanógenos, protozoarios y tienen la capacidad de incrementar la proporción molar de ácido propiónico y reducir la producción de CH₄ (Patra *et al.*, 2017; Soltan *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2011). Además, Beauchemin, McGinn, Martinez & McAllister (2007) sostienen que altas concentraciones de compuestos fenólicos mitigan la producción de CH₄ debido a la eliminación parcial de los protozoarios y de archaeas metanogénicas (Yuste, Amanzougarene, de la Fuente, de Vega & Fondevila, 2019). Resultados similares son reportados por Albores-Moreno *et al.* (2018), donde observaron que las hojas de *P. piscipula* y *L. leucocephala* redujeron la producción de CH₄ entérico en 15.6% a 31.6%, y aumenta la proporción de ácido propiónico y reducción en la proporción de ácido acético. En este sentido, Soltan *et al.* (2013) observaron que la inclusión de follaje de *L. leucocephala* que contiene TC disminuye la producción de CH₄ en 14.1%, esto debido al contenido de TC y su efecto sobre la población de protozoarios y bacterias encargadas de la síntesis de CH₄. Resultados similares fueron reportados por Tan *et al.* (2011), quienes evaluaron niveles crecientes de inclusión de *L. leucocephala* (10.0, 15.0, 20.0, 25.0 y 30.0 mg TC/500 mg de MS), reportando una reducción del 33.0% en la producción de CH₄ en la dosis superior (30.0 mg TC/500 mg de MS). La producción de CH₄ observada en este estudio en *T. diversifolia* y *M. alba* podría estar asociada a la alta digestibilidad de la materia orgánica (tabla 4). En este sentido, diversos autores afirman que, a mayor calidad de la dieta, la tasa de emisión de CH₄ es menor (Kurihara *et al.*, 1999). En este estudio se observó que las especies con mayor producción de CH₄ fueron *C. nlemfuensis*, *G. sepium* y *H. rosasinensis* (37.70, 40.49, 47.64 ml/g MS incubado) (tabla 4), lo cual es explicado por los bajos contenidos de TC y Sa. Las reducciones de la DEGMS y DEGMO para *P. piscipula* y *L. leucocephala*, *G. ulmifolia* y *B. alicastrum* (tabla 4) podrían estar relacionadas con el contenido de TC (0.19%, 1.16%, 0.47% y 0.22% de MS); ya que los TC pueden formar complejos con la lignocelulosa y proteínas (Reed, 1995) e inhibir directamente los microorganismos celulolíticos y la actividad de enzimas fibrolíticas, reduciendo la digestibilidad y la

fermentabilidad de los sustratos (Patra *et al.*, 2017). La menor DEGMS y DEGMO en *M. maximus* y *C. nlemfuensis* está asociada al alto contenido de fibras estructurales (> 70% de la MS) (Archimède *et al.*, 2011; Kennedy & Charmley, 2012; Kurihara *et al.*, 1999), lo cual reduce la tasa de pasaje e incrementa la cantidad de metano por unidad de MS incubada. Por otra parte, *G. sepium*, *T. diversifolia*, *M. alba* y *H. rosa-sinensis* obtuvieron mayor DEGMS (610.33-760.40, 800.16 y 800.66 g/kg de MS) y DEGMO (542.00, 698.90, 762.30 y 766.70 g/kg de MO), esto podría explicarse por las diferencias en la proporción de carbohidratos digeribles (RF y MF) y la baja proporción de celulosa (LF) (Hess *et al.*, 2003).

Conclusión

La inclusión de *L. leucocephala*, *P. piscipula*, *B. alicastrum* y *G. ulmifolia* en las dietas para rumiantes representa una alternativa de alimentación debido a su aporte de proteína cruda y baja producción de gas en condiciones *in vitro*, lo que podría contribuir a la reducción de las emisiones de CH₄. No obstante, cabe señalar que *T. diversifolia* y *M. alba* también se identificaron como una alternativa para la alimentación, debido a su alta degradabilidad. En este sentido, las combinaciones de estas arbóreas y arbustivas con pastos podrían representar una estrategia para mejorar el suministro de proteína durante las épocas de sequía en la región tropical.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento del proyecto *Efecto de los taninos condensados y saponinas sobre la microbiología y producción del metano y dióxido de carbono ruminal en condiciones in vitro e in vivo* con clave 6059.19-P. El primer autor agradece la beca otorgada por el Conacyt para realizar sus estudios de maestría en el Instituto Tecnológico de Conkal.

Referencias

- Albores-Moreno, S., Alayon-Gamboa, J. A., Miranda-Romero, L. A., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J.C., & Vargas-Villamil, L. (2018). Nutritional composition, *in vitro* degradation and potential fermentation of tree species grazed by ruminants in secondary vegetation (acahual) of deciduous forest. *Journal of Animal & Plant Science*, 28(5), 1263-1275. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-28-05/06.pdf>
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H., & Wells, J. (2008). Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*, 144(3-4), 212-227. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.10.014>
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., Lecomte, P., & Doreau, M. (2011). Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and Legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167(23), 59-64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2011.04.003>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official methods of analysis of AOAC international* (16th ed.). Washington D.C., USA: AOAC.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F., & McAllister, T. A. (2007). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 85(8), 1990-1996. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2006-686>
- Benaouda, M., González, M., Molina, L., & Castelán, O. (2017). Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de mitigación en América Latina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(4), 965-974. doi: <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v8i4.20>
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., & Prasad, C. S. (2015). Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on *in vitro* rumen fermentation, total protozoa and methane production. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 557-564. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12723>

- Castañeda-Serrano, R. D., Piñeros-Varón, R., & Vélez-Giraldo, A. (2017). Tropical tree fodder in sheep (*Ovis aries*) feeding intake, digestibility and balance nitrogen. *Boletín Científico de Museos de Historia Natural* 22, 58-68. doi: 10.17151/bccm.2018.22.1.4.
- Cochran, W. G., & Cox, G. M. (1990). *Diseños experimentales* (2ª ed.). -México: Trillas. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRISUM.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000156>
- Duch, J. (1988). *La conformación territorial del estado de Yucatán. Los componentes del medio físico*. México: Universidad Autónoma de Chapingo. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=sibe01.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=025610>
- Elmasry, A. M. A., Mendoza, G. D., Miranda, L. A., Vázquez, G., Salem, A. Z. M., & Hernández, P. A. (2016). Effects of types and doses of yeast on gas production and *in vitro* digestibility of diets containing maize (*Zea mays*) and lucerne (*Medicago sativa*) or oat hay. *South African Journal of Animal Science*, 46(4), 391–397. doi: <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i4.7>
- García, E. (1981). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen: Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. México: UNAM, Instituto de Geografía. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=libroan.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000649>
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization (FAO). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133417883>
- Gutiérrez-Báez, C., & Zamora-Crescencio, P. (2012). Especies leñosas de la selva baja caducifolia de Xmatkuil, Yucatán, México. *Foresta Veracruzana*, 14(2), 9–14. <https://www.redalyc.org/pdf/497/49728290002.pdf>
- 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. doi: <https://doi.org/10.1071/AR02241>
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2006). *IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories 4*. <http://www.ipcc.ch/>
- Johnson, K. A., & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8), 2483–2492. doi: <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- Kajikawa, H., Tajima, K., Mitsumori, M., & Takenaka, A. (2007). Effects of amino nitrogen on fermentation parameters by mixed ruminal microbes when energy or nitrogen is limited. *Animal Science Journal*, 78(2), 121–128. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00415.x>
- Kennedy, P. M., & Charmley, E. (2012). Methane yields from Brahman cattle fed tropical grasses and legumes. *Animal Production Science*, 52(4), 225–239. doi: <https://doi.org/10.1071/AN11103>.
- Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R. A., & McCrabb, G.J. (1999). Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition*, 81(3), 227- 234. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10434849>
- Makkar, H. P. S. (2006). Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. *BSAP Occasional Publication*, 34, 235-249. doi: <https://doi.org/10.1017/S146398150004245X>
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M., & Becker K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*, 73(6), 897–913. doi: <https://doi.org/10.1079/bjn19950095>
- Martin, C., Morgavi, D. P., & Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal*, 4(3), 351-365. doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731109990620>
- Melesse, A., Steingass, H., Schollenberger, M., Holstein, J., & Rodehutsord, M. (2017). Nutrient compositions and *in vitro* methane production profiles of leaves and whole pods of twelve tropical multipurpose tree species cultivated in Ethiopia. *Agroforestry Systems*, 93, 135–147. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0110-9>

- Menke, K. H., & Stengass, H. (1988). Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, 7-55. <https://www.scienceopen.com/document?vid=e1859372-e696-424a-85fb-d305b0b594bc>
- Miranda, R. L. A., Vázquez, M. P., Améndola, M. R., Sandoval, G. L., & González, O. R. (2015). Cuantificación de las fracciones fermentables de alfalfa y tuna por la técnica de producción de gas. In: Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ed.), *XXIV Congreso de la asociación Latinoamericana de producción animal y XL Congreso de la sociedad Chilena de producción animal*. Puerto Varas, Chile, 575. <http://www.sochipa.cl/uploads/media/ALPA2015.pdf>
- Monforte-Briceño, G. E., Sandoval-Castro, C. A., Ramírez-Avilés, L., & Capetillo, C. M. (2005). Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124(part 1), 313-327. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.016>
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and analysis of experiments* (8th ed.). New Jersey: Wiley & Sons.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(13), 13-24. doi: <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Pell, A. N., & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 1063-1073. DOI: 10.3168/jds. S0022-0302(93)77435-4
- Piñero-Vázquez, A. T., Jiménez-Ferrer, G., Alayon-Gamboa, J. A., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Aguilar-Pérez, C. F., & Ku-Vera, J. C. (2018). Effects of quebracho tannin extract on intake, digestibility, rumen fermentation, and methane production in crossbred heifers fed low-quality tropical grass. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 29-36. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1396-3>
- Poppi, D. P., & McLennan, S. R. (1995). Protein and energy utilization by ruminants at pasture. *Journal of Animal Science*, 73(1), 278-290. doi: <https://doi.org/10.2527/1995.731278x>
- Puchala, R., Animut, G., Patra, A. K., Detweiler, G. D., Wells, J. E., Varel, V. H., Sahl, T., & Goetsch, A. L. (2012). Methane emissions by goats consuming *Sericea lespedeza* at different feeding frequencies. *Animal Feed Science and Technology*, 175(1-2), 76-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.03.015>
- Ramos-Morales, E., Arco-Pérez, A., Martín-García, A. I., Yáñez-Ruiz, D. R., Frutos, P., & Hervás, G. (2014). Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulation to study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 57-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.016>
- Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1516-1528. doi: <https://doi.org/10.2527/1995.7351516x>
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Sallam, S. M. A., Lucas, R. C., Louvandini, H., Kreuzer, M., & Abdalla, A. L. (2013). Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition*, 67, 169-184. doi: <https://doi.org/10.1080/1745039X.2013.801139>
- Statistical Analysis Software (SAS). (2008). SAS Version 9.0. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Tan, H. Y., Sieo, C. C., Abdullah, N., Liang, J. B., Huang, X. D., & Ho, Y. W. (2011). Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3-4), 212-227. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004>
- Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., & Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(3), 321-329. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740580306>
- United Nations (UN). (2013). *Framework convention on climate change. Global warming potentials*. http://unfccc.int/ghg_data/items/3825.php
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.0022-0302(91)78551-2)

- Ventura-Cordero, J., González-Pech, P. G., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., & Tun-Garrido, J. (2017). Sheep and goat browsing a tropical deciduous forest during the rainy season: Why does similar plant species consumption result in different nutrient intake? *Animal Production Science*, 59(1), 66-72. doi: <https://doi.org/10.1071/AN16512>
- Vite, C., Martínez, P. A., Cortés, E., Purroy, R., Palma, J. M., & del Pozo, P. P. (2019). *Leucaena leucocephala* (LAM.) de wit especie clave para una producción bovina sostenible en el trópico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2), 331-357. <http://www.revista.cba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2707>
- Woodward, S. L., Waghorn, G. C., Lassey, K. R., & Laboyrie, P. G. (2002). Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 62, 227-230. <http://www.nzsap.org/proceedings/2002/does-feeding-sulla-hedysarum-coronarium-reduce-methane-emissions-dairy-cows>
- Yuste, S., Amanzougarene, Z., de la Fuente, G., de Vega, A., & Fondevila, M., (2019). Rumen protozoal dynamics during the transition from milk/grass to high-concentrate based diet in beef calves as affected by the addition of tannins or medium-chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology*, 257, 114273. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114273>